



Maria Inês Saraiva Veloso

Licenciada em Bioquímica

Avaliação da estabilidade de soro de leite após reticulação pela transglutaminase

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Prof^a. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz
Fernando, Professora Auxiliar FCT/UNL
Co-orientador: Prof^o. Doutor José Ricardo Ramos Franco
Tavares, Professor Auxiliar FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Arguente: Prof. Doutora Manuela Colla Carvalheiro, FF/UL
Vogal: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, FCT/UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2017



Maria Inês Saraiva Veloso

Licenciada em Bioquímica

Avaliação da estabilidade de soro de leite após reticulação pela transglutaminase

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Prof^ª. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz
Fernando, Professora Auxiliar FCT/UNL
Co-orientador: Prof^o. Doutor José Ricardo Ramos Franco
Tavares, Professor Auxiliar FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Benilde Simões Mendes, FCT/UNL
Arguente: Prof. Doutora Manuela Colla Carvalheiro, FF/UL
Vogal: Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, FCT/UNL



Setembro 2017

Avaliação da estabilidade de soro de leite após reticulação pela transglutaminase

COPYRIGHT© em nome de Maria Inês Saraiva Veloso,
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, e da
Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Na conclusão desta etapa da minha vida académica desejo manifestar o meu sincero e profundo reconhecimento às seguintes pessoas:

À minha orientadora, Prof. Doutora Ana Luísa Fernando, e ao meu co-orientador, Prof. Doutor Ricardo Franco, pela direcção do presente trabalho, pela partilha de conhecimento, pelo estímulo científico, disponibilidade e apoio prestado durante a realização desta dissertação.

A todos os professores que ao longo de todo o meu percurso escolar, pelo seu modo entusiasta e contagiante de ensinar, promoveram o meu interesse por várias áreas do Saber, enriquecendo-me como pessoa.

À minha colega e amiga, Sara Aguiar, que partilhou comigo os desafios da investigação científica. Com a sua constante boa disposição criou o melhor ambiente possível dando a sensação que as horas de trabalho corriam com mais fugacidade.

À minha colega de mestrado Maria Teresa Mendonça pelas várias viagens de carro que fizemos ao longo deste percurso académico em que fomos colegas. Agradeço o modo gentil como sempre se prontificou para me transportar de regresso a Lisboa.

A todos os colegas, alunos, investigadores, e funcionários dos laboratórios onde trabalhei, pelo companheirismo, apoio e diversão.

Aos meus amigos, que apesar de longe, se mantiveram sempre presentes na minha vida. Pela solidariedade, motivação, paciência e permanente diversão.

À minha família, e em especial aos meus padrinhos, pelo suporte, incentivo e sobretudo por todos os momentos em que me fizeram abstrair de todo o trabalho e simplesmente relaxar.

A todas as pessoas que se cruzaram comigo nesta vida e que de alguma forma me trouxeram aprendizagens.

Aos meus Pais por me mostraram o mais importante – nunca desistir daquilo que queremos e que acreditamos; e a capacidade de perdoar, essa é o verdadeiro amor. À minha mãe, o ser humano mais bondoso e forte que conheço, por me ensinar que devemos sempre levar um sorriso na cara. Ao meu pai, um espírito curioso e muito crítico, pelo estímulo em olhar tudo e mais, e ver. A eles e ao meu Avô dedico esta tese.

Partes do presente trabalho foram já publicadas:

Fernando AL, Aguiar SS, **Veloso MI**, Franco R (2017) Control of Milk Allergenicity, Journal of Dairy & Veterinary Sciences, 2 (5), 1-6.

Veloso MI, Aguiar SS, Franco R, Fernando AL (2017) Avaliação da estabilidade do soro de leite após reticulação da beta-lactoglobulina. In: Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (ed) Livro de Resumos do 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017, 52-53.

Aguiar SS, **Veloso MI**, Fernando AL, Franco R (2017) Controlo da capacidade alergénica do soro de leite por reticulação da β -lactoglobulina. In: Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (ed) Livro de Resumos do 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017, 63-64.

Partes do seguinte trabalho foram apresentadas publicamente sob a forma de poster:

Veloso MI, Aguiar SS, Franco R, Fernando AL (2017) Avaliação da estabilidade do soro de leite após reticulação da beta-lactoglobulina. 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017 (P1-11, com atribuição do 3º lugar, prémio do melhor poster).

Aguiar SS, **Veloso MI**, Fernando AL, Franco R (2017) Controlo da capacidade alergénica do soro de leite por reticulação da β -lactoglobulina. 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017. (P1-16)

Resumo

O soro de leite é um subproduto do fabrico de queijo ou iogurte considerado, até há pouco tempo, um mero resíduo sem qualquer valor económico. Porém, os avanços científicos têm vindo a revelar que as proteínas do soro de leite conferem a este produto importantes propriedades nutricionais e funcionais, sublinhando a importância do seu aproveitamento e valorização. Por esse motivo, a utilização de soro e derivados está em expansão.

No entanto, as proteínas do leite, presentes no soro, podem constituir um problema para a saúde humana, uma vez que se reconhece o seu elevado potencial alergénico. A principal proteína do soro de leite é a β -lactoglobulina, responsável por 66% das alergias ao leite, um dos tipos de alergias alimentares com maior prevalência. Torna-se portanto, essencial, procurar soluções para tentar minorar este problema.

A reticulação pela enzima transglutaminase (TG) é uma técnica que tem vindo a ser utilizada, que não envolve a utilização de produtos químicos, e na qual não é necessária a remoção das proteínas alergénicas, conseguindo-se um produto final não alergénico mas com o conteúdo proteico inalterado. No entanto, este processo necessita ainda de ser optimizado.

Neste estudo, procurou-se optimizar as condições de aplicação da transglutaminase, em termos de pré-tratamentos (essenciais ao funcionamento da enzima), da quantidade mínima de enzima a utilizar e também do tempo mínimo de reacção, em amostras de soro comercial e soro de queijo. A estabilidade da reticulação ao longo do tempo foi igualmente objecto de estudo. Recorreu-se às técnicas de FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier), eletroforese SDS-PAGE e à metodologia de Kuchroo e Fox para avaliação da reticulação, tendo-se demonstrado que a utilização do FTIR pode ser uma técnica robusta e rápida que permite acompanhar esse processo.

Os resultados apontam para uma optimização da reticulação quando o soro de queijo é previamente aquecido a 80 °C durante 1 hora, seguido do ajuste de pH a 7. Verificou-se que são necessários 8,5 mg de TG (100 U) por mililitro de soro e 6 horas para se atingir a fase estacionária da reticulação. O estudo indica que o soro reticulado é estável pelo menos por 7 dias.

Palavras-chave: soro de leite, alergénios, beta-lactoglobulina, reticulação, transglutaminase

Abstract

Whey is a by-product of the manufacture of cheese or yogurt and considered, until recently, a waste without economic value. However, scientific advances have shown that whey proteins give this product important nutritional and functional properties, underlining the importance of its use and valorization. For this reason, the use of whey and derivatives is expanding.

However, milk proteins may be a problem for human health given their high allergenic potential. The main whey protein is β -lactoglobulin, responsible for 66% of allergies to milk, one of the most prevalent types of food allergies. It is therefore essential to seek solutions to try to minimize this problem.

Crosslinking by transglutaminase is a technique that it is being used, which does not involve the use of chemicals and in which it is not necessary to remove allergenic proteins, that allows the production of a non allergenic end-product with the same protein content. Yet, this process still needs to be optimized.

Therefore, the aim of this study was to optimize the conditions of transglutaminase application, in terms of pre-treatments (essential to the functioning of the enzyme), of the minimum amount of enzyme to be used and also of the minimum reaction time, in commercial whey and cheese whey samples. Crosslinking stability over time was also studied. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), SDS-PAGE electrophoresis and the Kuchroo and Fox methodology were techniques used to evaluate the crosslinking process. It has been demonstrated that the use of FTIR can be a robust and fast technique that allows following the crosslinking process.

The results point to an optimization of the crosslinking when the whey is preheated at 80 °C for 1 hour, followed by the pH adjustment to 7. Results indicate that 8.5 mg TG (100 U) per milliliter of whey and 6 hours are needed to reach crosslinking stationary phase. The study indicates that the cross-linked whey is stable for at least 7 days.

Key-words: whey, allergenic, beta-lactoglobulin, cross-linking, transglutaminase

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
Índice.....	xv
Índice de figuras.....	xix
Índice de tabelas.....	xxv
Abreviaturas	xxix
1. Introdução.....	1
1.1. Soro do leite.....	1
1.1.1. Caracterização	1
1.1.2. Tratamento e valorização	3
1.1.3. Potencial alergénico	6
1.2. Controlo do potencial alergénico do soro de leite	8
1.3. Reticulação da β -lactoglobulina pela transglutaminase	13
1.4. Objectivos do trabalho	20
2. Materiais e Métodos	22
2.1. Caracterização do soro de queijo.....	22
2.1.1. pH e acidez	22
2.1.2. Lípidos	22
2.1.3. Proteína e azoto total.....	23
2.1.4. Matéria seca e cinza	24
2.1.5. Cloretos	24
2.1.6. Fósforo	24
2.1.7. Elementos minerais	25
2.2. Estudo de Pré-tratamentos aos soros.....	25
2.2.1. Soro comercial	25
2.2.2. Soro de queijo.....	26
2.3. Adição da transglutaminase.....	26
2.3.1. Optimização da concentração de enzima utilizada	26
2.3.2. Estudo cinético da reticulação de soro de queijo.....	27
2.4. Avaliação da estabilidade do soro de queijo reticulado com transglutaminase	27
2.5. Avaliação da reticulação pela transglutaminase nos soros	27
2.5.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	27

2.5.2.	Electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	29
2.5.3.	Avaliação da proteólise	30
2.5.3.1.	Azoto solúvel em água (WTC)	30
2.5.3.2.	Azoto não proteico (TCASN).....	31
2.5.3.3.	Azoto aminoacídico (PTASN).....	31
2.5.3.4.	Azoto amoniacal (NH ₃)	31
3.	Resultados e Discussão.....	32
3.1.	Soro comercial	32
3.1.1.	Optimização das condições de pré-tratamento	32
3.1.2.	Optimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento	50
3.2.	Soro de queijo	59
3.2.1.	Caracterização do soro de queijo.....	59
3.2.2.	Análise do soro de queijo simples e nas duas melhores condições de pré-tratamento.....	61
3.2.3.	Optimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento	67
3.2.4.	Estudo cinético da reticulação pela transglutaminase na melhor condição de pré-tratamento e com a melhor quantidade de enzima adicionada.....	73
3.2.5.	Avaliação da estabilidade do soro de queijo reticulado pela transglutaminase.....	75
4.	Conclusões	84
5.	Referências	86
ANEXOS	97
II. Materiais e métodos		97
II.1 Proteína/Azoto total e avaliação da proteólise		97
II.2. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....		97
III. Resultados e discussão.....		99
III.1. Soro comercial		99
III.1.1. Diferentes condições de pré-tratamento		99
III.1.2. Diferentes concentrações de transglutaminase adicionadas ao soro comercial preparado nas melhores condições de pré-tratamento.		100
III.2. Soro de queijo		104
III.2.1. Simples e preparado nas duas melhores condições de pré-tratamento.....		104
III.2.2. Diferentes concentrações de transglutaminase adicionadas ao soro de queijo preparado nas melhores condições de pré-tratamento.		105
III.2.3. Cinética da reticulação pela TG na melhor condição de pré-tratamento e com a melhor quantidade de enzima adicionada		109

III.2.4. Estabilidade do produto final	110
---	------------

Índice de figuras

Figura 1.1. Representação tridimensional da estrutura terciária da β -Lg, incluindo a sua estrutura secundária correspondente.	7
Figura 1.2. Reacções catalisadas pela transglutaminase: A) reacção de reticulação; B) reacção de acil-transferência; C) Desaminação (Jong e Koppelman, 2002).	14
Figura 1.3. Representação esquemática do mecanismo de agregação da β -lactoglobulina (adaptado de Schokker et al., 2000).	16
Figura 3.1. Regiões de energia (cm^{-1}) atribuídas às diferentes estruturas secundárias das proteínas. A vermelho escuro e claro estão representadas as folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo e as <i>random coil</i> a verde.	35
Figura 3.2. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em que a amostra não foi sujeita a nenhum tratamento (i), na janela $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.	35
Figura 3.3. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em que a amostra foi apenas sujeita a certo de pH (ii), na janela $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.	36
Figura 3.4. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em que a amostra foi apenas sujeita a aquecimento (iii), na janela $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.	36
Figura 3.5. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em a amostra foi sujeita a um acerto de pH e posteriormente ao aquecimento (iv), na janela $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.	37

Figura 3.6. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em a amostra foi sujeita a um aquecimento e posteriormente ao acerto de pH (v), na janela 1700-1600 cm^{-1} . A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo..... 37

Figura 3.7. Áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nas 5 condições de pré-tratamento. As barras a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. As barras a azul dizem respeito às folhas- β intramoleculares, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo..... 38

Figura 3.8. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nas 5 condições de pré-tratamento. As barras a vermelho correspondem às folhas- β intermoleculares, as azuis dizem respeito às folhas- β intramoleculares. As hélices- α são representadas a amarelo..... 40

Figura 3.9. Gel de poliacrilamida a 12%, com as 5 condições de pré-tratamento. **(A) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: sem acerto de pH, sem aquecimento; poços 5 e 6: sem acerto de pH, com aquecimento; poços 7 e 8: com acerto de pH, sem aquecimento. **(B) Os poços 2 e 4 têm adição de β -Me e os poços 3 e 5 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poços 2 e 3: com acerto de pH seguido de aquecimento; poços 4 e 5: com aquecimento seguido de acerto de pH. 44

Figura 3.10. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o soro comercial 10% nas 5 condições de pré-tratamento. A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal..... 48

Figura 3.11. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nas 2 condições de pré-tratamento seleccionadas, sem e com adição da enzima TG. As barras a vermelho correspondem às folhas- β e as hélices- α são representadas a amarelo. 52

Figura 3.12. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} . As barras a vermelho correspondem à condição (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento e as azuis à (v) com aquecimento seguido de acerto de pH. A gradação das cores do mais claro para o mais escuro é indicativo do respectivo aumento da quantidade de TG adicionada. 53

Figura 3.13. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (iv) com acerto de pH a 7, seguido de aquecimento, e com várias quantidades de TG adicionadas. **(A) Os poços 4, 6 e 8 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína. **(B) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 2, 4 e 6 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2 e 3: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína; poços 4 e 5: adição de 400 U TG g⁻¹ de proteína; poços 6 e 7: adição de 600 U TG g⁻¹ de proteína. 55

Figura 3.14. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (v) com aquecimento seguido de acerto de pH a 7, e com várias quantidades de TG adicionadas. **(A) Os poços 4, 6 e 8 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína. **(B) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 400 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 600 U TG g⁻¹ de proteína. 56

Figura 3.15. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o amostras preparadas nas duas melhores condições de pré-tratamento, (iv) e (v), e com a adição de adição de diversas quantidades de TG. A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal. 57

Figura 3.16. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm⁻¹, para o soro de queijo simples e preparado nas duas melhores condições – (iv) e (v). As barras a vermelho correspondem às folhas- β intermoleculares, as azuis dizem respeito às folhas- β intramoleculares. As hélices- α são representadas a amarelo. 62

Figura 3.17. Gel de poliacrilamida a 12% com amostras de soro de queijo simples e preparado nas duas melhores condições de pré-tratamento. **Os poços 2, 3 e 4 têm adição de β -Me e os poços 5, 6 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2 e 5: soro de queijo simples; poços 3 e 6: com acerto de pH seguido de aquecimento; poço 4 e 7: com aquecimento seguido de acerto de pH. 64

Figura 3.18. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o soro de queijo simples e preparado nas duas melhores condições de pré-tratamento, (iv) e (v). A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal. 66

Figura 3.19. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm⁻¹, nas 2 condições de pré-tratamento seleccionadas, sem e com adição da enzima TG. As barras a vermelho correspondem às folhas- β e as hélices- α são representadas a amarelo. 68

Figura 3.20. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} . As barras a vermelho correspondem à condição (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento e as azuis à (v) com aquecimento seguido de acerto de pH. A gradação das cores do mais claro para o mais escuro é indicativo do respectivo aumento da quantidade de TG adicionada. 69

Figura 2.21. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento, e com várias quantidades de TG adicionadas. **(A) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g^{-1} de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g^{-1} de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g^{-1} de proteína. **(B) Os poços 2, 4 e 6 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poços 2 e 3: adição de 200 U TG g^{-1} de proteína; poços 4 e 5: adição de 400 U TG g^{-1} de proteína; poços 6 e 7: adição de 600 U TG g^{-1} de proteína. 70

Figura 3.22. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (v) com aquecimento, e com várias quantidades de TG adicionadas. **(A) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g^{-1} de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g^{-1} de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g^{-1} de proteína. **(B) Os poços 2, 4 e 6 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poços 2 e 3: adição de 200 U TG g^{-1} de proteína; poços 4 e 5: adição de 400 U TG g^{-1} de proteína; poços 6 e 7: adição de 600 U TG g^{-1} de proteína. 72

Figura 3.23. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o amostras preparadas na melhor condição de pré-tratamento, (v), e com a adição da melhor quantidade de TG, 100 U TG g^{-1} . A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal. 73

Figura 3.24. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nos vários tempos de reacção com TG. As barras a vermelho correspondem às folhas- β e as hélices- α são representadas a amarelo. 76

Figura 3.25. Gel de poliacrilamida a 12% do estudo da cinética do soro de queijo com a 100 TG g^{-1} de proteína. Amostras **sem (A) e com (B) adição de β -Me.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: 0h; poço 3: 2h; poço 4: 4h; poço 5: 6h; poço 6: 8h; poço 7: 10h. 76

Figura 3.26. Evolução do pH do soro de queijo reticulado pela TG ao longo do período de armazenagem. 77

Figura 3.27. Evolução da acidez do soro de queijo reticulado pela TG ao longo do período de armazenagem. 78

Figura 3.28. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR (não apresentados), na janela 1700-1600 cm^{-1} , ao longo do tempo de armazenagem. As barras a vermelho correspondem às folhas- β e as hélices- α são representadas a amarelo. 79

Figura 3.29. Gel de poliacrilamida a 12% do estudo da avaliação da estabilidade do soro de queijo reticulado com transglutaminase, nas condições óptimas. Amostras **sem (A) e com (B) adição de β -Me**. Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: dia 0; poço 3: dia 3; poço 4: dia 7; poço 5: dia 10; Poço 6: dia 15..... 80

Figura 3.30. Percentagem de azoto (%N) da fracção de azoto solúvel em água (WTC), do soro de queijo reticulado pela TG, ao longo do tempo de armazenagem..... 82

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Composição genérica do soro de leite.....	2
Tabela 1.2. Casos de estudo da aplicação enzima transglutaminase na reticulação das proteínas do soro de leite.	18
Tabela 1.2. Casos de estudo da aplicação enzima transglutaminase na reticulação das proteínas do soro de leite (continuação).....	19
Tabela 3.1. Caracterização do soro de queijo.....	59
Tabela 3.2. Resultados da análise da cinza do soro de queijo.....	61
Tabela II.1. Lista de soluções utilizadas na metodologia adaptada de Kuchroo e Fox.....	97
Tabela II.2. Reagentes e respetiva quantidade para a realização de dois géis de poliacrilamida.	97
Tabela II.3. Lista de soluções e respetiva receita utilizadas na eletroforese de poliacrilamida em SDS.....	98
Tabela III.1. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento, sem acerto de pH.....	99
Tabela III.2. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (ii) com acerto de pH, sem aquecimento.	99
Tabela III.3. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iii) sem acerto de pH, com aquecimento.	99
Tabela III.4. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	100
Tabela III.5. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (v) com aquecimento seguido de acerto de pH.....	100
Tabela III.6. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.....	100

Tabela III.7. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.....	101
Tabela III.8. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.....	101
Tabela III.9. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.....	101
Tabela III.10. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	102
Tabela III.11. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.	102
Tabela III.12. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.	102
Tabela III.13. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.	103
Tabela III.14. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.	103
Tabela III.15. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.	103
Tabela III.16. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem acerto de pH, sem aquecimento.	104
Tabela III.17. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	104

Tabela III.18. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (v) com aquecimento seguido de acerto de pH.	104
Tabela III.19. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.....	105
Tabela III.20. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	105
Tabela III.21. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	105
Tabela III.22. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	106
Tabela III.23. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	106
Tabela III.24. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.....	106
Tabela III.25. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	107
Tabela III.26. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	107
Tabela III.27. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	107
Tabela III.28. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.	108

Tabela III.29. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro de queijo com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. 109

Tabela III.30. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo da avaliação da estabilidade soro de queijo na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, reticulado com 100 U de TG/g de proteína, durante 6 horas 110

Abreviaturas

α -La – α -lactoalbumina

β -Lg – β -lactoglobulina

β -Me – β -mercaptoetanol

AgNO₃ – Nitrato de prata

AFM – Microscopia de força atômica

BSA – Albumina do soro bovino

CaF₂ – Fluoreto de cálcio

CBO – Carência bioquímica de oxigênio

CBO₅/CQO – Índice de biodegradabilidade

CQO – Carência química de oxigênio

CMD – Oligossacarídeo carboximetildextrano

D₂O – Água deuterada; óxido de deutério

DLS – Dispersão dinâmica de luz

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

DTT – Ditionitrito

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; Ensaio de Imunoabsorção enzimática

FESEM – Microscopia electrónica de varredura com emissão de campo

FTIR – *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*; Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

GPC – Cromatografia de permeação de gel

H₂O – Água

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

Ig – Imunoglobulina

LAB – Bactérias do ácido láctico

L&B – Bolores e leveduras

KCl – Cloreto de potássio

KCrO₄ – Cromato de potássio

m/v – Massa/volume

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NEM – N-etilnealeimida

NH₃ – Azoto amoniacal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis*; Eletroforese em gel de poliacrilamida

pH –Potencial de hidrogénio

pI – Ponto isoeletrico

PM – Peso Molecular

PTA – Ácido fosfotúngstico

PTASN – Azoto solúvel em ácido fosfotúngstico

SEC – Cromatografia de exclusão de tamanho

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TCA – Ácido tricloroacético

TCASN – Azoto solúvel em ácido tricloroacético

TEMED – Tetrametiletilenodiamina

TG – Transglutaminase

WPC – Ensaio com 2,4,6-trinitrobenzenesulfonico

WPC – Proteína de soro concentrada

WPI – Proteína de soro isolada

WSN – Azoto solúvel em água

1. Introdução

1.1. Soro do leite

O leite é um alimento altamente nutritivo sendo, sobretudo, uma importante fonte proteica. Para além disso também fornece vitaminas e minerais, dos quais se podem destacar a vitamina D e o cálcio. Por esta razão foi desde sempre um alimento com um peso importante na alimentação a nível mundial (Martinho, 2008).

Pode ser utilizado de duas formas: directamente consumido na forma líquida, ou então ser usado como matéria-prima para a produção de uma vasta gama de produtos lácteos como por exemplo queijo, iogurte, manteiga, sobremesas lácteas, entre muitos outros. Estes produtos respondem não só às exigências do consumidor mas sobretudo à necessidade de conservar os nutrientes do leite, que é um alimento extremamente perecível (Soares, 2013) (Giroto e Pawlowsky, 2001).

O fabrico do queijo e do iogurte são processos relativamente complexos já que envolvem várias etapas. Em ambos os casos, duas das principais etapas são a coagulação da caseína seguida do dessoramento ou sinérese (Moreira, 2011) (Smithers, 2008). Nesta última obtém-se um subproduto – o soro – e é ele o objecto de estudo neste trabalho.

1.1.1. Caracterização

O soro é um líquido aquoso e com aspecto opaco. Tem uma coloração predominantemente amarela esverdeada que se deve à presença de riboflavina (vitamina B12) (Prazeres *et al.*, 2012).

O soro representa 85-95% do volume do leite e retém cerca de 55% dos seus nutrientes. É composto essencialmente por água, que corresponde a cerca de 93 a 94% da sua constituição. É também muito rico em lactose, já que a maior parte da lactose do leite aqui permanece, seguido das proteínas solúveis. As proteínas do soro representam cerca de 20% das proteínas do leite, sendo as principais a β -lactoglobulina, que representa cerca de 51% das proteínas totais do soro, e a α -lactoalbumina (22% das proteínas totais do soro). Para além destas existem muitos outros tipos de proteínas, cerca de sessenta, entre as quais podemos destacar as imunoglobulinas, a albumina do soro, a lactoferrina, a lactoperoxidase e o glicomacropéptido. O soro tem ainda quantidades apreciáveis de sais minerais, sobretudo NaCl e KCl, mas também sais de cálcio, de entre os quais se destaca o fosfato de cálcio. O ácido

lático e lipídios fazem também parte, bem como outros compostos minoritários como o ácido cítrico, compostos de azoto não proteicos - a ureia e o ácido úrico - e vitaminas, especialmente as do grupo B (Martinho, 2008) (Prazeres *et al.*, 2012) (Siso, 1996) (Smithers, 2008). A composição exacta varia um pouco consoante o tipo de leite usado, nomeadamente do tipo de animal do qual é proveniente esse leite. A espécie, a raça, o estado fisiológico do animal, o seu regime alimentar, algumas variações sazonais (nomeadamente o estágio de lactação), são alguns dos factores que podem levar a variações na composição, especialmente a nível do conteúdo proteico, lipídico e de lactose (Prazeres *et al.*, 2012) (Smithers, 2008). Existe também alguma diferença consoante a técnica utilizada para a produção do produto lácteo em questão, mais concretamente na forma como é conseguida a precipitação da caseína. Esta pode ser alcançada através da acidificação, o que resulta num soro ácido. Outra forma de precipitar a caseína é através de coagulação enzimática obtendo-se um soro que, por oposição ao anterior, é designado de soro doce. O soro ácido tem um maior teor de minerais e menor quantidade de proteínas do que o soro doce. Como tem um sabor acidulo e também é mais salgado, a sua utilização para fins alimentares é mais condicionada (Martinho, 2008) (Siso, 1997). Já o soro doce, de acordo com o *Codex Alimentarius* só pode ter uma acidez titulável até a um máximo de 0,16%, expressa em ácido láctico (Lagrange *et al.*, 2015). É mais rico em proteínas e tem um teor salino mais baixo quando comparado com o outro tipo de soro mencionado, sendo também mais rico em lactose (Siso, 1997).

A composição genérica do soro é apresentada na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Composição genérica do soro de leite.

CONSTITUINTE	SORO DOCE	SORO ÁCIDO
Sólidos totais	6,8%	7,0%
Lípidos ¹	0,8%	0,6% ¹
Proteínas ¹	11,4%	11,4%
Lactose ¹	75,0%	76,6%
Cinza ¹	7,8%	12,5%
Cálcio ¹	0,7%	1,8%
Fósforo ¹	0,6%	1,0%
Sódio ¹	0,8%	0,8%
Potássio ¹	2,5%	2,5%
Cloretos ¹	1,7%	1,7%

Adaptado de Bylund (1995)

¹Percentagem nos sólidos totais

1.1.2. Tratamento e valorização

Até à relativamente pouco tempo o soro de leite era considerado um mero resíduo sem qualquer valor económico. Assim as indústrias dos laticínios procuravam desfazer-se dele da forma mais económica possível (Smithers, 2008).

Numa fase inicial, sem qualquer tipo de tratamento, limitavam-se a descarregar este efluente em rios, lagos, oceanos (Prazeres *et al.*, 2012). Porém esta prática acabou por ser restringida e banida pois representava um sério perigo ambiental (Smithers, 2008).

O soro é altamente poluente. A sua carga orgânica é muito elevada, o que se deve em grande parte ao alto teor de lactose nele presente. Também as proteínas, os lípidos e outros sólidos suspensos contribuem para a contaminação. Para a avaliar usam-se parâmetros como a carência bioquímica de oxigénio (CBO), a carência química de oxigénio (CQO), que se devem encontrar na gama dos 0,1- 100 kg.m⁻³, e o índice de biodegradabilidade (CBO₅/CQO) que deve ter valores entre os 0,4 e os 0,8. No caso do soro de queijo qualquer um destes indicadores é muito elevado. A CBO é geralmente de 27-60 kg.m⁻³, a CQO é 50-102 kg.m⁻³, e a CBO₅/CQO é sempre superior a 0,5 (apresentando, portanto, características biodegradáveis). O soro pode originar contaminação inorgânica causada pela presença dos sais minerais (Prazeres *et al.*, 2012).

Devido às preocupações ambientais passou a depositar-se o soro em tanques/lagoas apropriadas ou procedendo-se à sua descarga no colector municipal. No entanto, a descarga em colector municipal causava sobrecarga do sistema de tratamento, uma vez que a deficiência em fósforo, o excesso de NaCl e de acidez, o teor de azoto amoniacal em solução elevado, e o baixo teor de ácidos gordos voláteis, afetam a eficiência de processos de tratamento biológicos (digestão anaeróbia e aeróbia). Assim, esta também não é a melhor alternativa uma vez que encarece muito o tratamento municipal. Outra opção são os tratamentos físicos-químicos sendo a coagulação e a floculação os mais simples e económicos de serem aplicados (Prazeres *et al.*, 2012) (Carvalho *et al.*, 2013).

O volume de leite produzido mundialmente está em franco crescimento (Smithers, 2008). Em 2013 a produção global de leite foi de 466 milhões de toneladas métricas. Cerca de 95% deste leite é utilizado para a manufactura de produtos derivados, sobretudo queijo, manteiga, leite em pó, mas também iogurtes, gelados, etc (Lagrange *et al.*, 2015). Tendo em conta que o soro é gerado como suproduto durante a fabricação de alguns destes, então o volume de soro produzido está também a aumentar.

No caso do queijo, por cada quilograma produzido obtém-se 9 kg de soro. Estima-se que a produção mundial de queijo seja de 40,7 x 10⁶ toneladas/ ano, o que equivale a 145 x 10⁶

toneladas de soro gerados por ano (Prazeres *et al.*, 2012). Deste modo os volumes deste subproduto são cada vez maiores e o destino a dar-lhes torna-se num problema ainda maior para a indústria de laticínios.

O aproveitamento e a valorização do soro de leite torna-se portanto uma necessidade premente.

Uma tentativa já antiga de valorizar o soro é através da fabricação de queijo de soro, que é conhecido por diferentes nomes consoante a região de onde é proveniente. A *ricotta* é o mais importante e mais conhecido de todos, sendo originário de Itália e popularizado nos USA. Em Portugal um produto semelhante é o requeijão. Tem uma diversa gama de aplicações, sendo usado como ingrediente para diversos molhos, pratos de massa, sobremesas, bolos ou tartes (Pintado *et al.*, 2001). Porém o seu mercado é bastante limitado e sobretudo o seu tempo de vida útil reduzido, não faz desta a melhor forma de aproveitamento do soro.

Com o avançar do conhecimento científico foi possível ficar a compreender melhor as características deste fluido e dos seus componentes. Verificou-se que se tratava de uma importante fonte nutricional e que portanto não podia de todo ser desperdiçado. Passou então a ser aproveitado, na forma líquida, como suplemento para alimentação animal e como fertilizante na agricultura. Ainda assim estas opções não traziam grande retorno económico (Smithers, 2008).

Os progressos da tecnologia permitiram utilizar novas técnicas, mais eficazes, para a recuperação e valorização do soro. O método mais comum é a produção de soro em pó, que para além de manter a qualidade por mais tempo, facilita também a manipulação e o seu transporte. Este é utilizado para incorporação em rações para animais, mas também para alimentação humana, sendo utilizado, em pequenas quantidades, no fabrico de gelados, bolos, molhos (Siso, 1996). Outra forma é a recuperação da lactose e das proteínas. Por cada litro de soro obtém-se cerca de 50 g de lactose e 10 g de proteínas (Prazeres *et al.*, 2012). A lactose purificada a partir do soro tem uma ampla gama de aplicações, desde a indústria alimentar até à farmacêutica (Smithers, 2008). No caso da proteína existem dois tipos de produtos: a proteína de soro concentrada (WPC) e a proteína de soro isolada (WPI). No primeiro, os métodos mais utilizados para a sua obtenção são a ultrafiltração e a diafiltração pois são relativamente baratos, rápidos e não provocam desnaturação ou modificação da estrutura das proteínas. Este tipo de produto tem uma elevada concentração de proteína (até 80%) e também alguma gordura (Lagrange *et al.*, 2015). É isento de lactose e de sal, sendo que este último factor o torna adequado para qualquer tipo de alimento humano incluindo para bebés (Siso, 1996). No caso do WPI é submetida a mais processamento que a WPC de modo a

remover, para além da lactose, também a gordura. Deste modo alcança-se uma concentração proteica ainda maior, até 90% (Lagrange *et al.*, 2015).

Por conseguinte, uma das suas principais aplicações é precisamente em fórmulas infantis. É também muito utilizado como suplemento proteico devido ao valor biológico das suas proteínas, que excedem o valor biológico da proteína do ovo, considerada até agora como referência. Para além disso é uma fonte muito rica de aminoácidos essenciais e de outros tipos de aminoácidos, como por exemplo os aminoácidos contendo enxofre, que desempenham importantes funções no nosso organismo (Lagrange *et al.*, 2015) (Smithers, 2008).

Outra aplicação cada vez mais em voga é a sua integração, como ingrediente principal, em bebidas de performance desportiva. Inúmeras investigações têm vindo a demonstrar que as proteínas de soro auxiliam no desenvolvimento de massa muscular, quando aliada à prática desportiva. A juntar a isto, a contínua validação dos efeitos benéficos destas proteínas na recuperação de lesões desportivas faz com que a procura deste tipo de produto tenha aumentado entre atletas de elite, e até entre casuais praticantes de desporto (Lagrange *et al.*, 2015).

O mercado destes produtos derivados de soro tem portanto registado uma expansão progressiva nos últimos 10 anos. Em 2013 foram comercializados cerca de 1,5 milhões de toneladas de produtos derivados do soro de leite, sendo os principais exportadores a UE e os USA, e os principais países importadores a China, a Indonésia e a Malásia. Isto deve-se, por um lado ao crescimento do mercado de fórmulas infantis, sobretudo na China e outros países asiáticos. Por outro, pelo progressivo aumento da procura dos consumidores por alimentos que promovam a sua saúde e o seu bem-estar, para além do simples valor nutricional (alimentos funcionais), verificando-se assim o desenvolvimento de novos e receptivos mercados (Lagrange *et al.*, 2015) (Smithers, 2008).

Para além dos já mencionados benefícios na performance desportiva, as proteínas do soro do leite têm vindo a ser associadas a várias e importantes implicações a nível fisiológico. Exemplo disto são: prevenção de sarcopenia, controlo da saciedade e do peso corporal, auxílio no controlo de infeções, prevenção de problemas hepáticos. Estas proteínas são também apontadas como sendo cardioprotectoras, probióticas (melhorando portanto a saúde intestinal), antidiabéticas, e anticancerígenas (Patel, 2015) (Cunha, 2015) (Smithers, 2008).

Outra das suas propriedades – antimicrobiana - fazem destas proteínas excelentes ingredientes para integrarem materiais para embalagens activas, e materiais de encapsulamento para a protecção e libertação de compostos bioactivos, como óleos

essenciais, óleos contendo ómega-3, probióticos, ou vitaminas, em alimentos funcionais. Para além disso, sendo um composto natural, é também comestível (Patel, 2015) (Smithers, 2008).

Actualmente na indústria alimentar as proteínas de soro de leite são mais utilizadas como aditivos devido às suas excelentes e variadas propriedades funcionais: gelificação, espumante, emulsificante. Contribuem desta forma para a melhoria da qualidade do alimento, sobretudo a nível da sua textura (Patel, 2015) (Cunha, 2015). Desta forma a indústria consegue também ir ao encontro dos anseios dos consumidores, que procuram produtos o mais naturais possível.

Podemos por tudo isto concluir que nos últimos anos o soro de leite, não só deixou de ser um entrave, como passou mesmo a ser um produto de valor acrescentado para a indústria dos lactícínios. É portanto relevante o seu estudo nas mais diversas vertentes.

1.1.3. Potencial alergénico

As alergias alimentares são o principal problema de saúde pública mundial afectando 1-2% da população adulta e 5-8% das crianças com idade inferior a três anos. Entre os alimentos que causam estas alergias encontram-se os ovos, os crustáceos, os amendoins, a soja, as nozes, o trigo, sendo que o leite de vaca ocupa o topo da tabela, constituindo 10-40% das alergias alimentares (Bu *et al.*, 2013).

A alergia ao leite é uma reacção imunológica anormal às proteínas do leite de vaca, que pode ser devido à interacção entre uma ou mais proteínas de leite, e um ou mais mecanismos imunitários, resultando em reacções mediadas por imunoglobulinas (IgE). Quando não há envolvimento do sistema imunitário não é alergia mas sim intolerância. A alergia ao leite incide em cerca de 0,3-7,5% da população mundial, sobretudo em crianças (El-Agamy, 2006). Caracteriza-se por ser de difícil diagnóstico uma vez que os sintomas não são específicos. Entre os principais podemos destacar: problemas ao nível da pele, como dermatite atópica, urticária, angiodema, erupção cutânea; também no tracto gastrointestinal, surgindo náuseas e vómitos, cólicas, diarreia, doença intestinal inflamatória, gastroenterite eosinofílica; problemas no sistema respiratório sendo o mais comum a rinite, mas também asma ou edema da laringe. Outros sintomas incluem dores de cabeça, anemia, irritabilidade e choque anafilático, podendo levar em casos extremos à morte (Micinski *et al.*, 2013) (El-Agamy, 2006).

A β -lactoglobulina (principal proteína do soro do leite) é responsável por 66% das alergias ao leite (Micinski *et al.*, 2013). Este facto pode estar relacionado com a inexistência desta proteína no leite humano e também por ser resistente ao ácido gástrico e ao ataque

proteolítico sendo por isso pouco digerível (Olivier *et al.*, 2012) (Villas-Boas *et al.*, 2010). É uma proteína com uma única cadeia polipeptídica constituída por 162 aminoácidos e apresenta uma estrutura secundária onde predominam as folhas β , 8 mais exactamente, e com apenas 1 hélice α . Em termos de estrutura terciária é uma proteína globular compacta. Pode surgir na forma de monómero, com um peso molecular de 18 kDa, ou na forma dimérica, predominantemente a pH neutro (36 kDa) (Figura 1.1.). Cada monómero tem duas ligações dissulfídicas intramoleculares que estabilizam a estrutura e um grupo sulfidrilo livre no interior da estrutura proteica. Apresenta polimorfismo genético. Sabe-se que tem como função ligar o cálcio e também o zinco, transportando-os, e ainda participa no transporte de retinol (Sharma *et al.*, 2001) (Kontopidis *et al.*, 2004) (Sawyer *et al.*, 1998) (Brownlow *et al.*, 1997) (Martinho, 2008) (Kuwata *et al.*, 1999) (Moro *et al.*, 2011).



Figura 1.1. Representação tridimensional da estrutura terciária da β -Lg, incluindo a sua estrutura secundária correspondente (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=2Q2M&bionumber=1>).

Também a α -lactoalbumina e a albumina do soro têm potencial alergénico, embora muito menos que a anterior (Micinski *et al.*, 2013).

Assim sendo o soro do leite, mais concretamente as suas proteínas, podem também constituir um problema para a saúde do Homem.

Atendendo a que o soro e os seus derivados estão em utilização crescente e tendo de igual modo em conta que nestes produtos as proteínas com potencial alergénico se encontram muito mais concentradas, é de esperar que apareçam muitos casos de reações alérgicas aos produtos mencionados. É portanto necessário procurar soluções para tentar minorar este problema.

1.2. Controlo do potencial alergénico do soro de leite

As alergias aos alimentos são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o sexto maior problema de saúde pública, sendo que a alergia ao leite é uma das que tem mais prevalência (Bu *et al.*, 2013). As proteínas presentes no soro são responsáveis por esta alergenicidade, em especial a β -lactoglobulina (Ball *et al.*, 1994). Regiões específicas destas proteínas, os epítomos, são reconhecidas por anticorpos que se ligam a receptores de células do sistema imunitário, que por sua vez libertam mediadores desencadeando reacção alérgica no organismo (Stadler e Stadler, 2003) (Jarvinen *et al.*, 2001) (Ball *et al.*, 1994) (Crittenden e Bennett, 2005) (Xin *et al.*, 2014). Assim qualquer alimento derivado do leite pode ser uma potencial fonte de alergias alimentares. Podemos destacar o soro do leite porque, por um lado, é um produto que está a ocupar cada vez mais lugar no mercado dos lacticínios, e por outro, porque tem elevado conteúdo proteico e portanto terá mais probabilidade de desencadear reacções alérgicas.

Actualmente a forma apresentada para prevenir e controlar este tipo de alergia tão comum recai praticamente na eliminação do consumo de produtos lácteos. Porém, tal solução torna-se bastante complicada uma vez que as proteínas do leite surgem com muita frequência em produtos processados, o que dificulta bastante as rotinas diárias dos consumidores com alergia às mesmas. Para além do mais, acresce ainda o facto dos produtos lácteos serem uma das principais fontes proteicas na dieta da generalidade da população, pelo que a sua eliminação pode levar de algum modo a uma deficiência nutricional, e no caso de crianças ou jovens pode afectar o seu crescimento (Bu *et al.*, 2013). Também do ponto de vista da indústria esta não é uma alternativa viável na medida em que perderia parte dos seus potenciais consumidores.

Assim, é muito conveniente para a indústria que, aliada à ciência, invista na procura de técnicas que permitam criar produtos lácteos hipoalergénicos, permitindo assim que qualquer pessoa os possa consumir e portanto alargar o seu mercado.

Foram já testadas diversas metodologias para controlar a alergenicidade do leite (Fernando *et al.*, 2017), sendo que um desses métodos passa pelo tratamento térmico. A maior parte do processamento dos alimentos envolve de facto processos térmicos, sendo os mais comuns a pasteurização e a esterilização. No caso do leite é mesmo obrigatório a aplicação de tratamento térmico de forma a garantir que tem qualidade microbiológica adequada ao consumo seguro (Micinski *et al.*, 2013). Sabe-se que quando um produto lácteo é submetido a aquecimento prolongado ocorrem importantes modificações ao nível da estrutura das proteínas nele contidas, nomeadamente a sua desnaturação. Sendo destruída a

estrutura organizada das proteínas, então também os epítomos são danificados, o que se traduz na diminuição da alergenicidade do produto final (Bu *et al.*, 2013). Existem de facto diversos estudos que indicam que produtos lácteos submetidos a este tipo de tratamento desencadeiam menos reacções alérgicas (Bu *et al.*, 2013). No entanto divergem em muito na temperatura (70-120 °C) que é necessário utilizar e no tempo de aplicação (15-30 minutos) (Bu *et al.*, 2013) (Micinski *et al.*, 2013). Isto pode estar relacionado em grande medida com o facto das proteínas do leite apresentarem grandes diferenças no que diz respeito à sua resistência ao calor. As proteínas do soro são as mais sensíveis ao aumento da temperatura. Sabe-se que, especificamente dentro deste grupo de proteínas, a α -lactoalbumina é a mais vulnerável, seguida da β -lactoglobulina, da albumina do soro bovina (BSA), e finalmente das imunoglobulinas, as mais resistentes. É necessário uma temperatura igual ou superior a 80 °C, durante um período de pelo menos 15 minutos para que se conseguia alcançar um mínimo de redução da alergenicidade (El-Agamy, 2007) (Micinski *et al.*, 2013).

No entanto, é de salientar que este tipo de processamento consegue apenas reduzir a alergenicidade, ou seja, não a elimina por completo. Existem várias publicações que o demonstram e há ainda algumas que apontam até para um eventual ligeiro aumento dessa mesma alergenicidade (Bu *et al.*, 2009) (Davis e Williams, 1998). Tal facto é explicado como sendo devido a epítomos que se encontram “escondidos” no interior da estrutura da proteína nativa, os quais ao iniciar-se o aquecimento são expostos devido ao desdobramento (*unfolding*) proteico que ocorre (Bu *et al.*, 2013). Há ainda que ter em consideração que o processamento térmico implica uma perda de qualidade do produto lácteo, quer em termos nutricionais quer em termos organolépticos, o que o torna menos atractivo para o consumidor (El-Agamy, 2007).

Devido a estas desvantagens, surgiram no mercado produtos lácteos hipoalergénicos em que o tratamento aplicado foi realizado através de digestão, ou hidrólise, proteica. De um modo geral, esta pode ser alcançada de duas maneiras. Uma delas é o processamento químico no qual se pode recorrer tanto à utilização de bases como de ácidos, embora estes últimos sejam mais eficazes (Biasutti, 2006) (Fernando *et al.*, 2017). O pH do meio pode levar à mudança do estado de ionização de resíduos de aminoácidos das cadeias laterais das proteínas e como consequência as interações entre as cadeias vão ser diferentes, reflectindo-se em alterações conformacionais. Tem portanto implicações na estabilidade da estrutura nativa das proteínas (Allain *et al.*, 1999) (Fang e Dalglish, 1997) (Fang e Dalglish, 1998). No entanto, este método apresenta desvantagens, como a hidrólise de aminoácidos essenciais, o que compromete o valor biológico do produto final, e também o facto de contribuir para um sabor desagradável, mais salgado, que se deve à adição de hidróxido de sódio para anular o ácido

clorídrico utilizado na digestão ácida das proteínas. Ainda assim o principal factor que torna este método pouco atrativo para aplicação prática pelas indústrias está relacionado com o facto de oferecer menos segurança ao consumidor que, com acesso a cada vez mais informação, não vê com bons olhos a utilização de produtos químicos nos produtos que consome (Martinho, 2008) (Fernando *et al.*, 2017).

A outra metodologia que pode ser aplicada é a hidrólise enzimática. Esta técnica tem sido mais utilizada que o controlo por digestão química, sendo a par do tratamento térmico já mencionado, uma das duas técnicas utilizadas para a produção de produtos lácteos hipoalergénicos disponíveis actualmente no mercado. Para tal são utilizadas enzimas que quebram as cadeias proteicas em vários e diversos péptidos e aminoácidos, levando ao desaparecimento de epítomos alergénicos (Bu *et al.*, 2013) (Duan *et al.*, 2014) (Izquierdo *et al.*, 2005). Foram já experimentadas diversas enzimas, quer individualmente quer em conjunto. Nos primeiros produtos preparados recorreu-se à utilização de enzimas digestivas, como a tripsina, a pepsina e a quimotripsina, na tentativa de imitar os processos digestivos. Verificou-se que quando se emprega uma combinação das duas últimas enzimas referidas é quando se consegue obter melhores resultados na redução da alergenicidade (Monaci *et al.*, 2006).

A comercialização destes hidrolisados levou à introdução de novos tipos de enzimas, de origem bacteriana e fúngica, que são mais específicas e mais fáceis de obter em grande quantidade (Micinski *et al.*, 2013) (Raksakulthai e Haard, 2003).

Este método apresenta a vantagem de poder também contribuir para a melhoria das propriedades funcionais do produto, nomeadamente no que diz respeito à sua textura. Mas fundamentalmente pelo facto de ser possível um maior aproveitamento nutricional já que os péptidos são de mais fácil absorção que as proteínas inteiras (Martinho, 2008).

Contudo, verificou-se que devido à libertação de péptidos e aminoácidos resultantes da proteólise, estes produtos apresentam um sabor amargo notório, o que os torna não aceitáveis para o consumidor (El-Agamy, 2007). É na verdade este um dos principais obstáculos à sua aplicação generalizada pela indústria (Martinho, 2008). Existem diversos procedimentos que vão sendo aplicados para mascarar este sabor desagradável: como a cromatografia de interação hidrofóbica, o tratamento com carvão activado, a encapsulação de tripsina em lipossomas ou lipoesferas (Martinho, 2008). Ainda assim, é a utilização de preparados de endo e exo-peptidases a forma à qual mais se recorre para melhorar o sabor do produto final, já que o seu sabor amargo característico não se desenvolve tanto (Micinski *et al.*, 2013) (Martinho, 2008). Para além disso é importante frisar, que tal como o tratamento térmico, este tipo de processamento consegue apenas reduzir a alergenicidade, ou seja, não a elimina por completo.

Se aliado a este tratamento enzimático, também se utilizar um tratamento térmico prévio, então a taxa de sucesso vai ser muito superior, ou seja, a diminuição da alergenicidade é muito mais significativa. Este resultado alcançado é justificado com a possível exposição dos locais de clivagem como consequência da desnaturação térmica, o que leva ao aumento da susceptibilidade da proteína à proteólise (Bu *et al.*, 2013) (Peyron *et al.*, 2006).

Nos últimos anos têm surgido outros estudos no controlo da alergenicidade dos produtos lácteos, envolvendo técnicas inovadoras em associação com o tratamento enzimático, que permitem complementá-lo e desta forma melhorar a sua eficácia (Micinski *et al.*, 2013). É o caso da aplicação de altas pressões, de radiação microondas e de ultrassons, que são métodos rápidos (Datt e Deeth, 1999) (Mecherfi *et al.*, 2015) (Izquierdo *et al.*, 2008) (Rial-Otero *et al.*, 2007). No caso dos ultrassons, que é uma técnica de baixo custo e ambientalmente viável, a sua utilização deve ser cautelosamente ponderada já que pode levar à formação de radicais livres; para reduzir a formação destes radicais a indústria pode utilizar aditivos alimentares, e.g. antioxidantes (Fernando *et al.*, 2017) (Santos e Capelo, 2007).

Também a adição de probióticos tem vindo a revelar-se útil para tornar mais eficaz o efeito da digestão enzimática, provavelmente porque também participam na degradação da estrutura macromolecular e portanto facilitam a acção posterior das enzimas utilizadas (Micinski *et al.*, 2013). Esta estratégia pode de igual modo funcionar individualmente uma vez que durante a fermentação por bactérias produtoras de ácido láctico, as enzimas proteolíticas ao atuarem sobre as proteínas podem degradar os epítomos e consequentemente contribuem para a redução da alergenicidade do produto lácteo em causa. A juntar a isto, acresce ainda o facto dos probióticos promoverem uma outra série de vantagens para a saúde humana, o que favorece ainda mais a expectativa de efectividade desta técnica (Bu *et al.*, 2013) (Bu *et al.*, 2010) (Jedrychowski, 1999).

Outro método que também parece ser promissor na redução da alergenicidade das proteínas é a possibilidade de conjugação do grupo amina das proteínas com açúcares redutores, pela reacção de Maillard, a qual é promovida pela acção da temperatura. Este processo apresenta benefícios adicionais uma vez que também melhora as propriedades funcionais do produto. Hattori *et al.* (1994) e Nagasawa *et al.* (1996) demonstraram que a conjugação da β -lactoglobulina com o oligossacarídeo carboximetil dextrano (CMD) melhorava a capacidade emulsionante desta proteína ao mesmo tempo que diminuía o seu potencial alergénico. Existem vários estudos que tentam encontrar os mecanismos responsáveis. Sugere-se, por exemplo, que o CMD cria uma barreira que envolve os epítomos impedindo assim a sua reacção com o sistema imunitário. Sabe-se que a eficácia deste método depende da quantidade de açúcares conjugados, dos seus pesos moleculares, e das condições reaccionais.

Contudo é uma técnica muito recente e que necessita ainda de mais investigação de modo a esclarecer qual o mecanismo que conduz à redução do potencial alergénico das proteínas. Também deve ser tomado em consideração os perigos derivados da formação de compostos na reacção de Maillard (reação química entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato redutor) nomeadamente da acrilamida que é cancerígena (Mottram *et al.*, 2002) (Stadler *et al.*, 2003). Também são produzidas melanoidinas que são compostos de cor acastanhada, o que para o caso dos produtos lácteos (caracterizados por uma cor próximo do branco ou amarelo) pode não ser muito aconselhável (Echavarría *et al.*, 2012). Esse conhecimento permitirá a optimização das condições para uma mais eficiente redução da alergenicidade, de modo a que o processo possa depois ser aplicado na indústria alimentar para a produção de produtos hipoalergénicos (Bu *et al.*, 2013) (Hattori *et al.*, 1994) (Nagasawa *et al.*, 1996).

Pelo exposto é possível concluir que a maioria dos métodos utilizados para controlar o potencial alergénico das proteínas do leite não são ainda totalmente satisfatórios (Bu *et al.*, 2013). Por um lado, porque não a eliminam por completo, o que seria de facto o ideal. A eliminação completa do potencial alergénico seria conseguida com a remoção das proteínas. No entanto perder-se-ia o valor nutricional do produto lácteo, sendo que no caso do soro essa perda seria praticamente integral, para além de representar também uma perda das propriedades funcionais. Em suma, o soro perderia todo o seu valor biológico deixando de ter interesse comercial. Por outro lado, os dois principais métodos apresentados (tratamento térmico e enzimático) levam ao aparecimento paralelo de sabores desagradáveis que diminuem a qualidade organoléptica do produto final obtido. Há ainda que considerar que pode existir o risco de aparecimento de novos epítomos aquando da utilização destes tratamentos, o que provocaria o efeito oposto ao pretendido.

É preciso portanto continuar a pesquisa por novas e mais eficazes tecnologias de processamento que permitam reduzir ao máximo o efeito alergénico das proteínas do leite.

A reticulação enzimática por ação da transglutaminase é uma técnica que tem despertado o interesse da comunidade científica e da indústria (Eissa *et al.*, 2006) (Eissa *et al.*, 2004) (Eissa e Khan, 2006) (Eissa e Khan, 2005) (Clare e Daubert, 2010) (Nogales, 2006) (Villas-Boas *et al.*, 2010) (Sabadin *et al.*, 2012) (Partschfeld *et al.*, 2007) (Agyare e Damodaran, 2010) (Báez *et al.*, 2011) (Gauche *et al.*, 2010) (Villas-Boas *et al.*, 2012) (Damodaran e Agyare, 2010) (Zhong *et al.*, 2013) (Huppertz, 2014) (Guache *et al.*, 2008) (Truong *et al.*, 2004) (Bagheru *et al.*, 2014). Isto deve-se ao facto da sua acção não envolver a utilização de produtos químicos e ser fácil de controlar. Além dessas vantagens, a utilização da transglutaminase pela indústria alimentar está autorizada pela União Europeia (UE) (EU, 2008). Não sendo necessária a remoção posterior das proteínas alergénicas consegue-se um produto final não alergénico mas

com o conteúdo proteico inalterado, ou seja, em princípio sem perdas funcionais do produto, com um impacto importante no seu valor comercial. No entanto, os estudos existentes ainda não permitiram que se alcançasse um consenso relativo à sua aplicação pela indústria alimentar, já que as condições óptimas ainda não foram sistematizadas. No próximo capítulo far-se-á uma revisão da literatura sobre a reticulação enzimática por ação da transglutaminase.

1.3. Reticulação da β -lactoglobulina pela transglutaminase

O uso de enzimas para modificação das estruturas das proteínas tem atraído considerável interesse já que se revela muito vantajosa. Alguns dos benefícios são: a elevada especificidade, o fácil controlo, o baixo risco de formação de compostos tóxicos, e sobretudo o facto de os consumidores percepcionarem as enzimas, que são usadas como aditivos, como sendo mais “naturais” que os aditivos químicos (Rodrigues-Nogales, 2006) (Ozrenk, 2006) (Fernando *et al.*, 2017).

Tem-se registado nos últimos anos um número crescente de estudos relativos à reticulação enzimática, mais concretamente para o caso específico da reticulação pela enzima transglutaminase (TG) (Ozrenk, 2006) (Kieliszek e Misiewicz, 2014). Várias enzimas permitem reticular proteínas (incluindo as do soro do leite) como a peroxidase de rábano, a fenol oxidase, a sulfidril oxidase, a tirosinase, a lacase, mas é a transglutaminase que é mais utilizada na medida em que é a única enzima aprovada pela União Europeia para fins alimentares (Wen-qiong *et al.*, 2017) (EU, 2008). Esta enzima é igualmente considerada segura (GRAS, *Generally Recognized as Safe*) (Kieliszek e Misiewicz, 2014).

A transglutaminase (E.C. 2.3.2.13.) é uma enzima que pertence à classe das transferases. Esta enzima catalisa a transferência de um grupo acil entre o grupo γ -carboxiamida dos resíduos de glutamina de uma cadeia péptidica (dador) e vários aceitadores (Figura 1.2.). Se o aceitador do grupo acil for uma lisina de uma cadeia péptidica então ocorre a reticulação que consiste na formação de ligações covalentes ϵ -(γ -glutaminil)lisina intra ou intermoleculares, no caso da glutamina e da lisina se encontrarem na mesma cadeia péptidica ou não. Como resultado formam-se polímeros de alto peso molecular. Esta é a reacção principal (Figura 1.2. A) mas outras duas reacções podem ocorrer também. O aceitador pode ser uma amina primária (Figura 1.2. B) ou pode ocorrer a reacção de desaminação, em que a água é o nucleófilo (Figura 1.2. C).

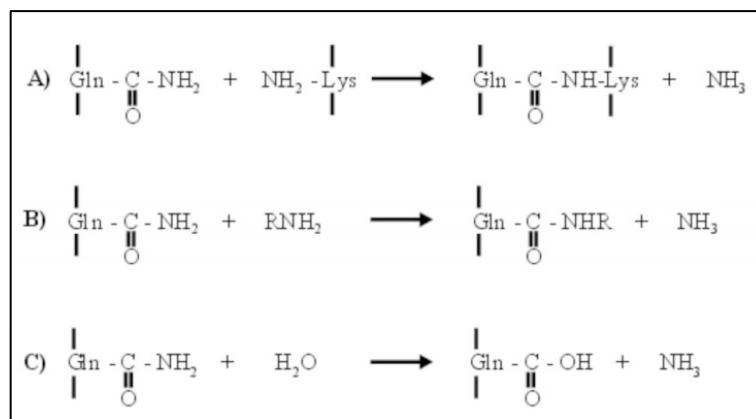


Figura 1.2. Reacções catalisadas pela transglutaminase: A) reacção de reticulação; B) reacção de acil-transferência; C) Desaminação (Jong e Koppelman, 2002).

Esta enzima foi primeiramente identificada por Heinrich Waelsch como sendo uma enzima do fígado (Ozrenk, 2006). Mas esta enzima está distribuída na natureza. Pode ser encontrada em vários tecidos de mamíferos, em vários invertebrados, em células microbianas e também em tecidos de plantas. Está envolvida em vários processos fisiológicos como por exemplo na coagulação, reacções de imunidade antibacteriana e na fotossíntese (Kieliszek e Misiewicz, 2014) (Jong e Koppelman, 2002).

Os primeiros estudos, em meados dos anos 80, foram feitos com TG de fígado de porquinhos da índia. Esta foi a primeira TG comercial disponível, porém a origem da matéria prima e os processos de extracção e purificação dispendiosos limitou a sua utilização pela indústria alimentar. Este problema foi mais tarde ultrapassado com o isolamento da enzima de origem microbiana sendo que actualmente a expressão genética permite a produção de TG em larga escala, de uma forma economicamente viável, segura para os consumidores e para o ambiente (Kieliszek e Misiewicz, 2014) (Tanimoto e Kinsella, 1988).

A transglutaminase microbiana é uma enzima monomérica, composta por uma única cadeia polipéptidica com 331 aminoácidos. Tem baixo peso molecular – 38 kDa – e um ponto isoeléctrico (pI) a pH 8,9. O seu centro activo é formado por uma cisteína, uma histidina e/ou por uma asparagina ou por um aspartato (Kieliszek e Misiewicz, 2014). Esta enzima não necessita de nenhum co-factor, ao contrário do que sucedia com a de origem animal que requeria a presença de iões cálcio para funcionar. Esta era também uma das desvantagens da enzima daí proveniente já que os alimentos podem não conter estes iões; a adição de iões cálcio também não era muito desejável pois em alguns casos resulta na formação de complexos indesejáveis (Jong e Koppelman, 2002). A sua actividade enzimática decai rapidamente a pH inferior a 5 ou superior a 8, o que pode ser explicado em termos de

protonação e desprotonação do sítio activo da enzima (cisteína), ou perda da estrutura conformacional desse mesmo local, tendo como resultado a desnaturação da enzima (Eissa *et al.*, 2004). O valor de pH óptimo é o neutro (Eissa e Khan, 2005). No que diz respeito à temperatura, o valor ideal para esta enzima é 40 °C. Na versão comercial, como a TG vem numa mistura com a maltodextrina, que é um hidrato de carbono, o que aumenta significativamente a sua estabilidade térmica para valores mais elevados, é habitual a utilização de 50 °C nas reacções (Kieliszek e Misiewicz, 2014). Este é mesmo o valor indicado nas informações dadas por uma das empresas que mais frequentemente fornece o preparado de TG (Eissa *et al.*, 2004). A sua actividade enzimática pode ser promovida pela presença de iões de cobalto, bário e potássio ou inibida por zinco, cobre, mercúrio e chumbo (Kieliszek e Misiewicz, 2014).

A modificação das estruturas das proteínas pela TG traduz-se numa alteração das suas propriedades funcionais: solubilidade, capacidade emulsionante, espumante. Tal facto permite que a TG tenha um amplo espectro de potenciais aplicações em várias indústrias. Desde produtos medico-farmacêuticos, cosméticos, têxteis, mas é na Indústria Alimentar que esta enzima tem sido mais explorada. Aqui é maioritariamente utilizada para melhorar a textura e a aparência dos produtos alimentares; é muito usada em produtos de carne ou peixe, lacticínios e também na indústria da panificação. Permite também o desenvolvimento de novos produtos como filmes para prolongar o tempo de prateleira de alimentos (Kieliszek e Misiewicz, 2014).

No caso concreto dos produtos lácteos, a TG é adicionada principalmente a iogurte e a queijos. Permite prevenir a sinérese e tornar estes alimentos mais homogéneos, com uma textura firme e consistente mas ao mesmo tempo cremosa (Lorenzen *et al.*, 2002) (Wróblewska *et al.*, 2011) (Ozrenka, 2006). Têm vindo a ser apontadas outras potencialidades de aplicação desta enzima, como a redução da alergenicidade das proteínas do leite (Sabadin *et al.*, 2012) (Wróblewska *et al.*, 2011). Ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), testes em ratinhos, com crianças e testes dermatológicos revelaram uma significativa redução da alergenicidade da β -lactoglobulina quando reticulada pela TG (Olivier *et al.*, 2012) (Villas-Boas *et al.*, 2010) (Villas-Boas *et al.*, 2012) (Oliver *et al.*, 2012). O mesmo também já foi descrito para outras proteínas alergénicas como o gluten (Zhu e Tramper, 2008).

Das diversas proteínas do leite, as caseínas são um óptimo substrato para a TG já que têm uma estrutura desordenada, flexível. Já as proteínas do soro são mais difíceis de reticular o que se deve à sua estrutura globular compacta que torna os resíduos de lisina e glutamina menos acessíveis e portanto menos disponíveis para a reacção com a TG. Portanto um pré-requisito para a actuação desta enzima será a suficiente exposição destes resíduos de aminoácidos, que é conseguida pela quebra das estruturas quaternária, terciária e secundária

das proteínas. Há várias formas de atingir este objectivo através de pré-tratamentos. Um dos tratamentos mais comum é a adição de ditioneitol (DTT), um agente redutor que quebra ligações dissulfídicas que mantêm a estrutura proteica. Contudo este não pode ser utilizado em produtos alimentares pelo que o uso de outros redutores como por exemplo a cisteína ou o β -mercaptoetanol têm vindo a ser estudados. Outro método seria a adição de solventes orgânicos mas que também não é desejável pela indústria uma vez que seria necessária a extracção da proteína reticulada o que é dispendioso (Koppelman e Jong, 2002). Há outras alternativas mais viáveis como é o caso da hidrólise por enzimas como a alcalase, a bromolína ou a neutrase (Sabadin *et al.*, 2012), ou a desnaturação por aquecimento. Estas alternativas são já por si só utilizadas para redução da alergenicidade do leite e no caso do tratamento térmico também serve antes de mais para a higienização. O aumento da temperatura leva a uma progressiva desorganização das proteínas. Primeiramente ocorre uma dissociação dos dímeros em monómeros que são mantidos por ligações não covalentes. Segue-se uma desnaturação parcial dos monómeros nativos. Há quebra das ligações de hidrogénio levando à perda dos arranjos da estrutura secundária, como as hélices- α e as folhas- β . O grupo tiol livre e aminoácidos hidrofóbicos ficam mais expostos permitindo agora que estes monómeros não nativos possam reagir estabelecendo principalmente ligações dissulfídicas, ou então, em muito menor quantidade, ligações não covalentes. Ocorre um rearranjo de novas estruturas secundárias, nomeadamente folhas- β intermoleculares. Formam-se por conseguinte dímeros não nativos e pequenos oligómeros. Finalmente estes pequenos polímeros podem reagir entre si, também por ligações dissulfídicas, e originar agregados muito maiores (Figura 1.3.). Assim, pelo aquecimento, associado à desnaturação ocorre também um fenómeno de agregação proteica.

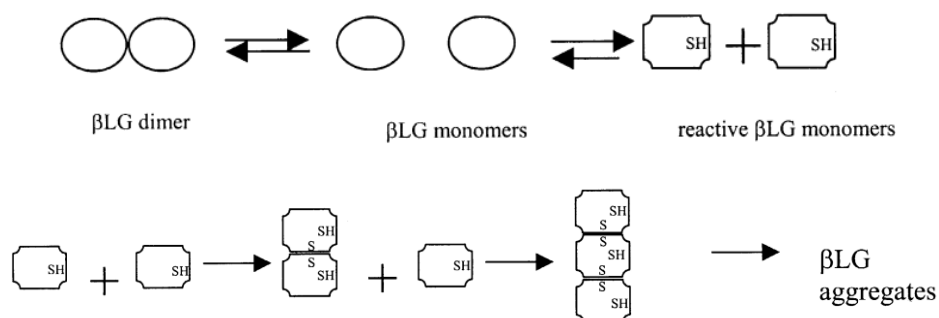


Figura 1.3. Representação esquemática do mecanismo de agregação da β -lactoglobulina (adaptado de Schokker et al., 2000).

Convém frisar que estes agregados são diferentes dos obtidos por reticulação enzimática com TG. Os obtidos a partir da desnaturação térmica não têm uma estrutura tão definida e compacta como os últimos (Báez *et al.*, 2011) (Gauche *et al.*, 2010) (Figura 1.4.). A temperatura óptima para a quebra da estrutura das proteínas do soro de leite de vaca é 80 °C aplicada por um período de 1 hora (Villas-Boas *et al.*, 2010) (Eissa e Khan, 2005) (Rodriguez-Nogales, 2006).

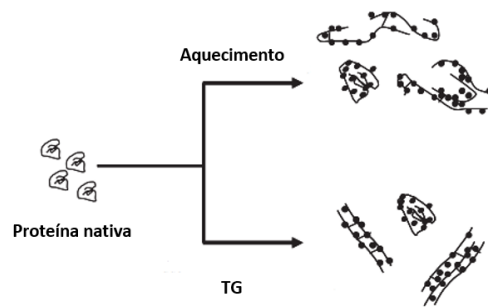


Figura 1.4. Diferentes estruturas dos agregados de β -lactoglobulina formados por tratamento térmico ou com transglutaminase (TG) (adaptado de Báez *et al.*, 2011).

Existe muita literatura relativa à reticulação pela TG das proteínas do soro de leite principalmente da β -lactoglobulina. Assim, seguidamente na tabela 1.2. apresentam-se alguns casos de estudo, indicando-se o tipo de matriz utilizado, o tipo de pré-tratamentos aplicados, as condições de adição e reacção da TG e os métodos utilizados para análise.

Tabela 1.2. Casos de estudo da aplicação enzima transglutaminase na reticulação das proteínas do soro de leite.

MATRIZ	PRÉ-TRATAMENTO	TRATAMENTO COM TG	ANÁLISE	REFERÊNCIA
β -Lg	Térmico (80°C/1h) Químico (DTT/ β -Me)	TG 50 U/g (50°C/12h)	FTIR	Eissa <i>et al.</i> , 2006
WPI em pó	Químico (NEM)	TG (50°C/5h)	SDS-PAGE; medições reológicas; FESEM	Eissa <i>et al.</i> , 2004
WPI em pó	Químico (DTT)	TG 10 U/g (50°C/5h)	Medições reológicas	Eissa e Khan, 2006
WP em pó	Térmico (80°C/1h)	TG 10 U/g (50°C/10h)	SDS-PAGE; Medições reológicas; SEC; Microscopia confocal;	Eissa e Khan, 2005
WPC	Químico (DTT/glucosamina)	TG	BCA; Electroforese ; Espectroscopia electronica de varredura	Clare e Daubert, 2010
Leite	Térmico (84,5°C/1h)	enzima/substrato 0,02 (m/m) (40°C/30min)	Electroforese capilar	Nogales, 2006
β -Lg	Térmico (80°C/1h) Químico (Cisteína)	TG 25 U/g (50°C/3h)	SDS-PAGE, Immunoblotting, ELISA	Villas-Boas <i>et al.</i> , 2010
β -Lg	Térmico (80°C/1h) Químico (hidrólise enzimática com proteases: alcalase, bromolina, neutrase, 25 U/g)	TG 25 U/g (50°C/3h)	Método TNBS, Electroforese, HPLC de fase reversa, Immunoblotting, ELISA	Sabadin <i>et al.</i> , 2012
β -Lg		TG 12,5 U/g de proteína (40°C/1h/400MPa)	GPC	Partschfeld <i>et al.</i> , 2007
WPC em pó	dispersão (tampão fosfato 10mM pH7, 0,002% azida de sódio; 23°C/2h)	TG (contendo β -Me) 50 U/g de substrato de proteína (37°C durante vários tempos)	DSC; Electroforese	Agyare e Damodaran, 2010
β -Lg	Químico (Cisteína)	TG 1U/g (40°C/30-180 min)	Electroforese; Estudos de fluorescência; medições reológicas	Báez <i>et al.</i> , 2011
WP	Térmico (75-95 °C) tendo concluído que 82 °C era a temperatura de desnaturação	TG 50 U/g (36 °C/240 min= 4h)	Medições reológicas	Gauche <i>et al.</i> , 2010

Tabela 1.2. Casos de estudo da aplicação enzima transglutaminase na reticulação das proteínas do soro de leite (continuação).

MATRIZ	PRÉ-TRATAMENTO	TRATAMENTO COM TG	ANÁLISE	REFERÊNCIA
β-Lg	Térmico (80°C/1h) Químico (Cisteína)	TG 25 U/g (50°C/3h)	SDS-PAGE, HPLC de fase reversa, ELISA	Villas-Boas <i>et al.</i> , 2012
WPI	Choque térmico (70 °C/ 1,5 e 10 min)	TG 50 U/g (37 °C/ vários tempos, sendo o melhor 30h)	DSC; Electroforese	Damodaran e Agyare, 2010
WPI	Térmico (80 °C/ 15 min)	TG três concentrações (50°C/várias tempos)	SDS-PAGE; DSC; DLS; zeta-potencial; AFM	Zhong <i>et al.</i> , 2013
Leite magro em pó	Térmico (30° C/60 min)	TG 0,05 g/L (30 °C/24h)	SDS-PAGE	Huppertz, 2014
WP em pó	-	TG 50 U/g (36 °C/240 min= 4h)	SDS-PAGE; medições reológicas	Guache <i>et al.</i> , 2008
WPI	Químico (DTT)	TG 0,12-10 U/g (40 °C/ vários tempos até 8h)	SDS-PAGE; Western blotting; medições reológicas	Truong <i>et al.</i> , 2004
WPI	Térmico (80 °C/ 15 min)	TG (50 °C/15h)	Tamanho das partículas; morfologia de partículas; AFM; FTIR; dispersão; degradação <i>in vitro</i> de partículas de WPI	Bagheru <i>et al.</i> , 2014

β -Lg (β-lactoglobulina) FESEM (Microscopia eletrônica de varredura com TNBS (Ensaio com ácido 2,4,6-
emissão de campo) trinitrobenzenesulfônico)
DTT (Ditiotreitol)
β -Me (β-mercaptoetanol) SEC (Cromatografia de exclusão por tamanho) GPC (Cromatografia de permeação de gel)
TG (Transglutaminase) NEM (N-etilmaleimida) DLS (Dispersão dinâmica de luz)
FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier) ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) WPI (Proteína de soro isolada)
SDS-PAGE (Electroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato) HPLC (Cromatografia líquida de alta eficiência) WPC (Proteína de soro concentrada)
AFM (Microscopia de força atômica) DSC (Calorimetria diferencial de varredura)

1.4. Objectivos do trabalho

O soro de leite é um subproduto do fabrico de queijo ou iogurte, sendo considerado até há pouco tempo, um mero resíduo sem qualquer valor económico. Porém, os avanços científicos têm vindo a revelar que as proteínas do soro de leite conferem a este produto importantes propriedades nutricionais e funcionais, sublinhando a importância do seu aproveitamento e valorização. A utilização do soro de leite está em crescimento, sendo as fórmulas infantis e as bebidas de *performance* desportiva a sua aplicação mais usualmente conhecida.

No entanto, as proteínas do leite podem constituir um problema para alguns consumidores dado o seu elevado potencial alergénico. A principal proteína do soro de leite é a β -lactoglobulina, responsável por 66% das alergias devidas ao leite, um dos tipos de alergias alimentares com maior prevalência. Atendendo a que a procura de soro e seus derivados está em expansão em termos de tecnologia alimentar, e tendo em conta que nos produtos onde são incorporadas, as proteínas com potencial alergénico se encontram muito mais concentradas, é de esperar que se manifestem novos casos de reações alérgicas. É portanto necessário procurar soluções para tentar minorar este problema.

A reticulação enzimática por ação da transglutaminase é uma metodologia de controlo do potencial alergénico do soro de leite, que tem despertado o interesse tanto da comunidade científica, como da indústria, dado não envolver a utilização de produtos químicos e ser fácil de controlar. Além dessas vantagens, a utilização da transglutaminase pela Indústria Alimentar está autorizada pela União Europeia. Não sendo necessária a remoção posterior das proteínas que causam alergia, consegue-se um produto final não alergénico mas com o conteúdo proteico inalterado, ou seja, sem perda funcional do produto, com um impacto importante no seu valor comercial.

Neste trabalho pretendeu-se estabelecer as bases para a obtenção de um soro de leite de baixa alergenidade, através do desenvolvimento de um processo eficaz, capaz de efectuar a reticulação proteica, principalmente da β -lactoglobulina, usando a enzima transglutaminase. Com o estudo pretende-se otimizar o pré-tratamento, essencial ao funcionamento da enzima, e a quantidade de TG e tempo de contacto a utilizar nos ensaios. No estudo pretende-se também avaliar a estabilidade e o tempo de prateleira do produto final obtido nas condições optimizadas. Para análise do processo de reticulação serão utilizadas as técnicas de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e a metodologia de Kuchroo e Fox. O FTIR é uma técnica espectroscópica disponível desde o início dos anos 70. Tem sido aplicada na análise da

qualidade alimentar, por exemplo em laticínios (leite e queijo), carne, óleos e manteigas, sumos, e é coerente com outras técnicas utilizadas para o mesmo propósito (Voort, 1992) (Voort *et al.*, 1993) (Iñón *et al.*, 2004) (Chen e Irudayaraj, 1998). Porém, neste contexto da avaliação da reticulação enzimática ainda é pouco usada. A validação da sua aplicabilidade neste campo será muito útil porque é uma técnica simples, rápida, precisa e requer pouca quantidade de amostra (Voort, 1992). Como parte complementar ao trabalho pretende-se também verificar se esta técnica pode ser usada como método de análise e acompanhamento do processo de reticulação das proteínas do soro com recurso à transglutminase. As outras duas técnicas referidas servem para corroborar os resultados do FTIR.

O estudo será realizado em amostras reais, ou seja, em soro de queijo líquido, assim como em amostras comerciais de soro de leite liofilizado, nas versões habitualmente usadas como aditivos alimentares e no treino desportivo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização do soro de queijo

O soro de queijo utilizado foi fornecido pela *Lactovouga – lacticínios e derivados Lda*, uma empresa de produção de queijos, na região de Viseu. As amostras foram recolhidas nas instalações da referida empresa, em Abril de 2017, e transportadas numa mala térmica para a Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL. Ficaram congeladas até utilização.

Cada parâmetro analisado para a caracterização do soro, foi efectuado em duplicado.

2.1.1. pH e acidez

O pH foi determinado recorrendo a um medidor de pH (*Crison micro pH 2001*), devidamente calibrado com padrões de pH 7 e 4 antes de cada utilização.

Para medir a acidez utilizou-se o método volumétrico. Titulou-se com solução aquosa de NaOH 0,1N, na presença de fenolftaleína, até se obter um tom rosa pálido. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido láctico (g.L⁻¹)(AOAC, 1990).

2.1.2. Lípidos

A matéria gorda foi determinada pelo método gravimétrico (AOAC, 1990). Num erlenmeyer colocou-se 20 mL da amostra e juntou-se 80 mL de água desionizada previamente aquecida a 60°C, 1mL de amónia concentrada (NH₃ 25% m/m, *Panreac*), e deixou-se a agitar durante 15 minutos. Seguidamente, a mistura foi neutralizada com ácido clorídrico concentrado (HCl 37% m/m, *Fisher Scientific*), adicionando-se, depois da neutralização, mais 10 mL do mesmo ácido clorídrico, e colocou-se num banho a 95 °C durante 20 minutos.

Deixou-se arrefecer a mistura até à temperatura ambiente e transferiu-se para uma ampola de decantação.

De seguida, para permitir a separação do conjunto das substâncias lipídicas, o respectivo erlenmeyer foi lavado com 10 mL de álcool 95%, que foi depois adicionado à ampola. Repetiu-se o processo por mais duas vezes, mas com 25 mL de hexano (95%, *Fisher Scientific*).

Após agitação, deixou-se em repouso para permitir a separação de fases. Posteriormente procedeu-se à decantação, sendo a fracção orgânica recolhida para um balão previamente tarado, e a fracção aquosa recolhida novamente para o erlenmeyer. Esta última é ainda lavada por mais duas vezes com 30 mL de hexano, repetindo-se depois a agitação em ampola de decantação e separação de fases.

O balão com a totalidade da fracção orgânica foi colocado num banho a 95 °C até evaporação do solvente, e depois transferido para uma estufa (*WTB binder*) a 103 ± 2 °C, onde permaneceu durante 1 hora. Mais tarde foi colocado no exsicador para arrefecer, sendo finalmente pesado (balança *Mettler Toledo AB204*).

O teor de matéria gorda foi calculado por diferença de pesos e expresso em g.L⁻¹.

2.1.3. Proteína e azoto total

A proteína bruta foi determinada por quantificação do azoto total pelo método de Kjeldahl (Watts & Halliwell, 1996) e convertendo este valor em proteína bruta considerando que a totalidade do azoto está na forma proteica.

Resumidamente, mediram-se 5 mL de amostra para um tubo de digestão ao qual se adicionou 10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (95-97% m/m, *Chem-Lab*), uma porção de mistura catalisadora (tabela II.1, em anexo), e reguladores de ebulição. A amostra foi digerida no digestor *tecator 2006* a 360°C, até a amostra ficar transparente.

A amostra digerida foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL que se aferiu com água ultra-pura, e depois filtrada, através de papel de filtro *Whatman n.º 40*, para um frasco e reservada para ser posteriormente destilada (e também para a medição do fósforo).

Num tubo de reacção, colocaram-se 10 mL da solução anterior, 90 mL de água destilada e 3 gotas de fenolftaleína. Procedeu-se à alcalinização do meio com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 6 N (98,5%, *JMS, José Manuel Gomes dos Santos*) até à viragem do indicador fenolftaleína, ou seja, até a solução ficar cor-de-rosa. O tubo foi depois submetido a uma destilação por arrastamento de vapor num aparelho *KJELTEC SYSTEM 1002 Distilling Unit*, sendo recolhido o destilado num erlenmeyer com uma solução de 50 mL de ácido bórico ($\geq 99\%$, *Fisher Chemical*) e 0,5 mL de solução indicadora de ácido bórico (tabela II.1, em anexo). Considerou-se a reacção completa quando o erlenmeyer contendo a solução de ácido bórico recolheu 200 mL de destilado. A presença de azoto no destilado é avaliada pela mudança de cor da solução de ácido bórico de roxo para cor verde.

O destilado foi titulado com uma solução padronizada de H₂SO₄ 0,02N (*Chem-Lab*, 95-97%) até ao aparecimento de cor roxa permanente.

O teor em proteína bruta foi claculado através da multiplicação do valor de azoto total por um factor de conversão baseado na percentagem de azoto na proteína (em

média 16%). Assim utilizou-se o factor de 6,25 exigido pelo Regulamento (UE) N. 1169/2011.

O resultado foi apresentado em g.L⁻¹.

2.1.4. Matéria seca e cinza

Para a determinação da matéria seca e cinza seguiu-se o método AOAC (1990). Sumariamente, pesaram-se as cápsulas previamente colocadas numa mufla (*Heraeus Electronic*) a 550 ± 50 °C, durante 1h, e arrefecidas num exsiccador. Seguidamente mediram-se 10 ml de amostra para cada cápsula e levou-se a evaporar em banho-maria. Utilizou-se uma estufa *WTB binder E28* a 103 ± 2 °C durante 2 horas para secar a matéria residual. As cápsulas foram então novamente pesadas determinando-se a matéria seca por diferença de peso.

As cápsulas contendo a matéria seca foram de novo à mufla durante 2 horas, sendo depois arrefecidas e pesadas, tendo-se determinado a cinza por diferença de peso.

Os resultados da matéria seca e da cinza foram expressos em g L⁻¹.

Foi utilizada uma balança *Mettler Toledo AB204* em todas as pesagens.

2.1.5. Cloretos

A determinação de cloretos foi efectuada pelo método de titulação volumétrica (AOAC, 1990). Adicionou-se 1 mL de cromato de potássio (KCrO₄) a 10 mL de amostra e procedeu-se à titulação da mesma com nitrato de prata (0,0141N AgNO₃), até à formação de cor pêssego permanente.

O ensaio foi efectuado em duplicado e foi efectuado um branco (com água destilada).

Os resultados foram expressos em g Cl⁻. L⁻¹.

2.1.6. Fósforo

Para a determinação do fósforo foi utilizada a digestão a quente com H₂SO₄ descrita na secção 2.1.3 (Watts & Halliwell, 1996), seguida pela determinação dos fosfatos por espectrofotometria de absorção molecular, através da formação de um complexo corado com uma solução de molibdato de amónio na presença de ácido ascórbico e tartarato de potássio e antimónio (Watanabe & Olsen, 1965).

Resumidamente, foi construída uma recta de calibração de absorvância a 880 nm versus concentração de fósforo (mg.L^{-1}), preparando-se diversas soluções de diferentes concentrações de fósforo (0; 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,30 mg P.L^{-1}), às quais se adicionou 8 mL de agente redutor (250 mL H_2SO_4 5 N + 75 mL molibdato de amónio 40 g.L^{-1} + 2,6 g ácido ascórbico + 25 mL tartarato de potássio e antimónio $2,8 \text{ g.L}^{-1}$, em 500 mL), tendo-se aferido a 100 mL. A medição da absorvância destas soluções foi efectuada após 20 minutos.

Para a determinação do fósforo na amostra, utilizou-se 0,2 mL da solução reservada (ver secção 2.1.3.) e adicionou-se uma gota de fenolftaleína e alcalinizou-se com NaOH 6 N até mudança do indicador. De seguida juntaram-se 8 mL de agente redutor, aferiu-se a 100 mL e efectuou-se a leitura da absorvância após 20 minutos.

A determinação foi realizada em duplicado e foi utilizado um espectrofotómetro *Shimadzu UV-120-11* para todas as observações.

Os resultados foram expressos em g P. L^{-1} , obtendo-se a concentração da amostra por interpolação da recta de calibração e considerando a diluição efectuada.

2.1.7. Elementos minerais

A cinza obtida como descrito em 2.1.4. foi utilizada para a determinação dos vários minerais pelo método de absorção atómica descrito por Vandecasteele e Block (1993). A cinza foi digerida com 10 mL de HNO_3 1:1 em banho-maria a 95°C durante 20 minutos, filtrada para um balão de 100 mL, que se aferiu. Efectuaram-se duas diluições (1:20 e 1:400) para permitir a medição dos elementos presentes nas amostras em maior concentração.

Foram então determinadas as concentrações de sódio, potássio, cálcio, magnésio e ferro, num espectrofotómetro de absorção atómica (*Thermo Electro Corporation MSeries*) e os resultados foram expressos em mg.L^{-1} .

2.2. Estudo de Pré-tratamentos aos soros

2.2.1. Soro comercial

O soro de leite comercial em pó (*Total Whey, Gold Nutrition*), foi dissolvido em água destilada, de modo a se obter uma solução a 10%. A mistura foi agitada durante 1h até o soro se dissolver por completo.

Foram preparadas cinco condições de pré-tratamento antes da adição da TG:

- i. Sem acerto de pH e sem aquecimento;

- ii. Com acerto de pH e sem aquecimento;
- iii. Sem acerto de pH e com aquecimento;
- iv. Com acerto de pH seguido de aquecimento;
- v. Com aquecimento seguido de acerto de pH.

O aquecimento das amostras foi feito num banho (*memmert*) a 80°C, durante 1h.

O acerto de pH a 7 é feito recorrendo a um medidor de pH (*Crison micro pH 2001*). Para se atingir o pH desejado é adicionado à amostra uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0.1N (98,5%, *JMS, José Manuel Gomes dos Santos*) uma vez que a mistura de soro comercial a 10% apresenta, na maioria dos casos, um pH inferior a 7.

Estas amostras foram congeladas até análises futuras.

2.2.2. Soro de queijo

Preparou-se o soro de queijo nas condições com acerto de pH seguido de aquecimento (iv) e com aquecimento seguido de acerto de pH (v). Para tal colocou-se a amostra de soro de queijo num banho de água a 80°C (*memmert*) durante 1h e acertou-se a pH 7 (*Crison, micro pH 2001*) com a adição de NaOH 0.1N (98,5%, *JMS, José Manuel Gomes dos Santos*), pela ordem correspondente. Tal como para o soro comercial, as amostras foram congeladas para análises posteriores.

2.3. Adição da transglutaminase

2.3.1. Optimização da concentração de enzima utilizada

Este estudo foi realizado em ambas as amostras, soro comercial e soro de queijo, nas condições de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (iv) e com aquecimento seguido de acerto de pH (v).

Foram testadas diversas concentrações de transglutaminase (TG) (*Ajinomoto Activa TI*):

- 50 U de TG/g de proteína a 600 U de TG/g de proteína.

Após a adição da enzima, agitou-se as amostras durante 20 minutos, e seguidamente colocou-se na estufa (*WTC binder, 7200*) a 50°C durante 14 horas e 30 minutos. Posteriormente, colocou-se as amostras num banho de água e gelo a 4°C durante 10 minutos para parar a reação. As amostras foram congeladas.

2.3.2. Estudo cinético da reticulação de soro de queijo

O estudo cinético da reticulação do soro de queijo pela transglutaminase realizou-se com a condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de ajuste de pH (v), com a adição de transglutaminase na concentração 100 U/g de proteína.

Realizou-se uma cinética de 10 horas na estufa (*WTC binder, 7200*) a 50°C, retirando-se alíquotas de duas em duas horas. Posteriormente colocou-se as referidas alíquotas num banho de água e gelo a 4°C durante 10 minutos a fim de parar a reação de reticulação. As alíquotas foram congeladas.

2.4. Avaliação da estabilidade do soro de queijo reticulado com transglutaminase

Prepararam-se amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de ajuste de pH (v). Adicionou-se a enzima transglutaminase na concentração 100 U/g de proteína, agitou-se durante 20 minutos, e seguidamente colocou-se na estufa (*WTC binder, 7200*) a 50°C durante 6 horas. Posteriormente, colocou-se as amostras num banho de água e gelo a 4°C durante 10 minutos para parar a reação.

Uma das amostras foi logo congelada para análises posteriores, correspondendo portanto ao dia 0. As restantes amostras foram colocadas no frio, a 4°C, e retiradas nos dias 3, 7, 10 e 15 após a reacção de reticulação.

Foram avaliados o pH e a acidez (determinados pelos métodos já descritos no ponto 2.1.1.). Foi ainda feita uma análise por FTIR, SDS-PAGE e a determinação do teor de azoto solúvel em água, cujo procedimento será descrito no ponto 2.5.3.1.

2.5. Avaliação da reticulação pela transglutaminase nos soros

As amostras dos vários estudos efectuados, com soro comercial e de soro de queijo, foram analisadas através de três técnicas diferentes, detalhadas em seguida, para avaliação dos pré-tratamentos e da adição de TG para reticulação nos soros.

2.5.1. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As características estruturais das proteínas alimentares são frequentemente estudadas por espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) com a finalidade de

determinar a relação entre a sua função e a sua estrutura (Lefèvre e Subirade, 1999) (Arrondo *et al.*, 1989).

Resumidamente, baseia-se na absorção de energia pelas ligações químicas que se estabelecem nas proteínas. Esta absorção ocorre quando a radiação recebida se situa na mesma frequência de vibração das ligações.

Devido à sua versatilidade e facilidade de manuseamento, a técnica de FTIR permite o estudo de proteínas globulares em solução aquosa, em sistemas complexos, como sistemas biológicos ou no estado funcional, como um gel ou um filme, assim como de proteínas no estado sólido e em emulsões (Lefèvre e Subirade, 1999) (Jackson *et al.*, 1995) (Allain *et al.*, 1999). Esta técnica fornece uma ferramenta de diagnóstico sensível que permite monitorizar a natureza das mudanças que ocorrem na conformação da proteína (Jackson *et al.*, 1995) (Allain *et al.*, 1999).

A espectroscopia de FTIR permite estudar diversos aspectos da estrutura proteica, como a sensibilidade ao calor, à pressão, às variações de pH, à desnaturação química, ou às modificações causadas devido ao ambiente aquoso em que a proteína está inserida.

Esta técnica apresenta diversas vantagens tais como o baixo custo do equipamento, maior sensibilidade, o curto tempo de medição, a pequena quantidade de amostra necessária (entre 10 µg a 100 µg), não é destrutiva, e não apresenta limitações a nível do tamanho da proteína (Jackson *et al.*, 1995) (Barth, 2007). Contudo, a concentração da proteína em solução não pode ser superior a 50 mg/mL (Lefèvre e Subirade, 1999).

As amostras foram medidas no espectrofotómetro de FTIR (*PerkinElmer*) em duas regiões espectrais distintas, 1700-1600 cm⁻¹ e 3100-2800 cm⁻¹. Estas regiões correspondem às regiões da amida I e amida A e B, respetivamente. A região de amida I foi escolhida uma vez que, de todas as bandas de amida, é a mais sensível à estrutura secundária das proteínas. Por sua vez a região de amida A e B foi selecionada de forma a verificar os resultados apresentados na literatura que testam a forma como as vibrações de alongamento da ligação N-H permitem verificar alterações na estrutura da proteína (Eissa *et al.*, 2006). A principal desvantagem da espectroscopia de infravermelhos de soluções aquosas é a forte absorção da água a cerca 1645 cm⁻¹ (Jackson *et al.*, 1995) (Barth, 2007), a qual se sobrepõe à importante banda da amida I de proteínas. Na técnica de FTIR a banda da água é muito intensa, mascarando as bandas desejadas no espectro, nomeadamente as bandas que surgem nas regiões 1700-1600 cm⁻¹. Por esta razão, as amostras a analisar foram previamente liofilizadas para eliminar a água presente na solução. Congelou-se então as amostras em azoto líquido e deixou-se a liofilizar durante a noite. Posteriormente, as amostras liofilizadas são dissolvidas em óxido de deutério, também designada de água deuterada (D₂O) (*Sigma Aldrich*), até concentração final de 9%. A água

deuterada é muito utilizada para substituir a água, permitindo dissolver as proteínas e visualizar as bandas correspondentes às estruturas secundárias das mesmas. Para realizar o FTIR, foram pipetados 7 µl de amostra, que se colocam entre duas janelas de fluoreto de cálcio (CaF₂), 25x4mm (*Sigma Aldrich*). Por cada medição foram efectuados 4 varrimentos. Foram feitas três repetições por amostra.

É ainda importante mencionar que se realizou um branco nas mesmas condições, mas em lugar da amostra colocou-se D₂O (*Sigma Aldrich*).

Analizou-se os espectros obtidos através da média previamente calculada dos 3 espectros obtidos experimentalmente, no software *PeakFit versão 4.12*, que permite fazer a desconvolução das bandas. Através do ajuste das bandas com funções lorentzianas, conseguiu-se fazer a atribuição das estruturas secundárias da proteína em estudo. Posteriormente foi calculada a área analítica de cada uma dessas bandas, o que permitiu determinar as quantidades relativas de cada estrutura secundária.

2.5.2. Electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A electroforese SDS-PAGE é um método amplamente usado para o estudo de proteínas, e a reticulação proteica não é excepção, como é possível comprovar pela tabela 1.2. (secção 1.3.). Resumidamente, consiste na separação das moléculas de acordo com o seu tamanho quando é aplicado um campo eléctrico. As proteínas mais pequenas irão migrar mais rapidamente enquanto que as maiores ficam retidas junto aos poços.

A análise de proteínas através da eletroforese em géis de poliacrilamida foi realizada com o kit da *Bio-Rad, Mini – PROTEAN Tetra System*, em géis de resolução a 12% e géis de separação a 5% (tabela II.2, em anexo).

As amostras foram adicionadas a um volume igual de tampão de amostra com e sem β-mercaptoetanol (β-Me) (tabela II.3, em anexo). No caso das amostras de soro comercial, estas tiveram de ser antecipadamente diluídas até concentração de 30 mg de proteína.mL⁻¹.

O marcador de pesos moleculares, *Low Range* da *Bio-Rad*, foi adicionado a uma mistura de água ultra-pura e tampão de amostra (tabela II.3, em anexo) conforme indicações do fabricante.

Em seguida, colocou-se as amostras e o marcador num banho de água em ebulição, durante 10 minutos.

Finalmente, centrifugou-se as amostras (*Centurion Scientific, k3 Series, NORLEQ*) a 12000 rpm durante 2 minutos.

Os géis, após se encontrarem polimerizados, foram colocados no suporte e posteriormente na tina (Bio-Rad, Mini – PROTEAN Tetra System) em tampão de corrida 1:10 (tabela II.3, em anexo). Os poços foram carregados com 5 µL de marcador de pesos moleculares e com 10 µL de amostra.

Colocaram-se os géis a correr durante 60 minutos a 170 volts.

Após o término da corrida, os géis foram colocados numa mistura 1:3 de solução corante e solução descorante (tabela II.3, em anexo) durante 90 minutos. De seguida os géis foram transferidos para um recipiente com solução descorante, tendo esta sido trocada aquando de saturação, e até se conseguirem ver nitidamente as bandas desejadas.

Por último, colocaram-se os géis numa solução de 1:2 de água e solução descorante para hidratar.

2.5.3. Avaliação da proteólise

Foram determinadas várias fracções proteicas usando a metodologia adaptada de Kuchroo e Fox (1982) (Soares, 2013) (Silva, 2000), a fim de se determinar a quantidade de proteínas de pequenas dimensões, de péptidos, de resíduos de aminoácidos e de amoníaco presente nas amostras em estudo.

Começou-se por centrifugar as amostras a analisar durante 45 minutos a 3000g (*Sigma Laboratory centrifugues 4K15C, rotor 12256*) e decantou-se. Seguiu-se uma filtração do decantado, com recurso a papel de filtro Whatman n.º 40. Do filtrado analisou-se, em duplicado, as fracções em seguida detalhadas.

Todos estes resultados foram expressos em percentagem de azoto.

2.5.3.1. Azoto solúvel em água (WTC)

Num tubo de digestão adicionou-se 10 mL da amostra, centrifugada, decantada e filtrada, uma percentagem de mistura catalisadora (tabela II.1, em anexo), regularizadores de ebulição e 10mL de H₂SO₄ concentrado (95-97% m/M, *Chem-Lab*). As amostras foram a digerir no digestor *tecator 2006*, a 360°C. Após a digestão colocou-se as amostras, e respetivas lavagens do tubo digestor, num balão de 100mL e perpez-se o volume com água ultra-pura. De seguida filtrou-se as amostras através de papel de filtro Whatman n.º 40, e alíquotas de 10 mL foram analisadas pelo método de Kjeldahl, já descrito na secção 2.1.3.

2.5.3.2. Azoto não proteico (TCASN)

O teor de azoto não proteico foi determinado por adição de TCA (ácido tricloroacético) (*PanReac AppliChem*) (tabela II.1, em anexo) a 24%, a porções de 10 mL de filtrado, sendo a mistura agitada e mantida em repouso por 2 horas, à temperatura ambiente.

A mistura foi depois filtrada, colocada a digerir, determinando-se o teor de azoto pela técnica de Kjeldahl.

2.5.3.3. Azoto aminoacídico (PTASN)

A uma toma de 10 mL da solução em estudo (centrifugada, decantada e filtrada) adicionou-se H_2SO_4 3,95M (95-97% m/m, *Chem-Lab*) (tabela II.1, em anexo) e PTA (ácido fosfotúngstico) (82% m/m, *Acros Organic*) (tabela II.1, em anexo). Deixou-se a mistura a 4°C durante a noite. Posteriormente, filtrou-se a mistura e colocou-se a digerir e destilar conforme já foi descrito em pontos anteriores.

2.5.3.4. Azoto amoniacal (NH_3)

Alíquotas de 20 mL da amostra foram directamente analisadas (isto é, eliminou-se o passo da digestão, que precedia na análise das fracções anteriores) pelo método de Kjeldahl.

3. Resultados e Discussão

3.1. Soro comercial

Primeiramente, estudou-se com o soro comercial liofilizado, a optimização das condições de pré-tratamento. Após a identificação das melhores condições, prosseguiu-se para a optimização da dose de TG. A optimização das condições de acção da TG no soro comercial, serve de base para o estudo da reticulação em amostras de soro de queijo, e é depois utilizada no estudo da avaliação da estabilidade da reticulação.

3.1.1. Optimização das condições de pré-tratamento

O soro de leite é constituído maioritariamente por água, lactose e proteínas, sendo que estas últimas conferem ao soro importantes propriedades nutricionais e funcionais. A β -lactoglobulina e α -lactoalbumina são as proteínas maioritárias, representando 51% e 22%, respectivamente, da constituição proteica do soro. A primeira é a mais alergénica, provavelmente também pelo facto de estar presente em maior quantidade, e daí ser o principal alvo na tentativa de diminuição da alergenicidade de produtos lácteos. Uma das estratégias para se atingir este objectivo passa pela reticulação da referida proteína pela transglutaminase. Esta enzima catalisa a formação de ligações isopeptídicas entre resíduos de aminoácidos de lisina e glutamina, e desta forma os epítomos alergénicos ficam “escondidos” no interior da estrutura polimérica formada e portanto indisponíveis para reagir com o sistema imunitário. Porém, para tal é necessário que os referidos resíduos de aminoácidos estejam suficientemente expostos e disponíveis. Como a β -lactoglobulina tem uma estrutura tridimensional compacta é necessário desnaturá-la previamente, o que pode ser conseguido por meio de aquecimento, sendo 80 °C a temperatura óptima (Eissa *et al.*, 2006) (Rodriguez-Nogales, 2006) (Eissa *et al.*, 2004) (Eissa e Khan, 2005)(Clare e Daubert, 2010). Daí a necessidade de estudar alguns pré-tratamentos que envolvem a possibilidade de desnaturação das proteínas.

Convém ainda mencionar que a α -lactoalbumina também vai ser reticulada uma vez que também ela é desnaturada. Para além disso, mesmo que não seja sujeita a nenhum tratamento para desnaturação, esta proteína como não tem estrutura tão compactada será sempre reticulada pela enzima, o que pode ser conveniente uma vez que também tem potencial alergénico.

Por outro lado, é igualmente importante que o pH do soro se encontre a 7 já que este é o valor de pH ótimo de actuação da transglutaminase (Agyare e Damodaran, 2010)(Villas-Boas *et al.*, 2010) (Sabadin *et al.*, 2012). Como o pH registado no soro comercial (e depois também mais tarde no soro de queijo) foi sempre inferior a 7 (sendo o valor médio 6,26), então teve de se proceder a um acerto deste valor para 7, para que a acção da enzima fosse optimizada.

Por conseguinte, em primeiro lugar, realizou-se um estudo preliminar com soro comercial para avaliar o efeito do aquecimento e do pH nas proteínas do soro.

Para tal, preparou-se uma solução de soro comercial em cinco condições de pré-tratamento (assim designado, uma vez que é anterior á utilização da transglutaminase), a saber:

- (i) Sem acerto de pH, sem aquecimento
- (ii) Com acerto de pH, sem aquecimento
- (iii) Sem acerto de pH, com aquecimento
- (iv) Com acerto de pH seguido de aquecimento
- (v) Com aquecimento seguido de acerto de pH

As duas últimas condições (iv e v) permitem ainda verificar se há diferenças entre acertar o pH antes do aquecimento ou depois deste.

Para fazer a análise recorreu-se à técnica de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Esta dá informação sobre a estrutura secundária das proteínas, permitindo averiguar que mudanças estruturais e conformacionais ocorrem a quando do tratamento térmico. Para além disso, a estrutura das proteínas também depende fortemente do pH do meio envolvente, uma vez que contém vários grupos carregados (Fang e Dalgleish, 1997). Assim alterações provocadas pelo acerto do pH também podem ser avaliadas por esta técnica.

Fez-se a leitura das cinco amostras em duas regiões espectrais diferentes: de 1600-1700 cm^{-1} e de 2800-3100 cm^{-1} . A primeira, conhecida por região amida I, é utilizada sempre que se estudam proteínas uma vez que é característica destas macromoléculas, e corresponde fundamentalmente às vibrações de alongamento dos grupos C=O da cadeia central de um péptido (e também do grupo C-N) (Lefèvre e Subirade, 1999) (Eissa *et al.*, 2006). A outra janela mencionada foi também utilizada pois nesta gama observam-se as vibrações dos grupos C-H presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes, e que assim dão informação das interações hidrofóbicas que desempenham um papel importante na formação de agregados (Eissa *et al.*, 2006). Durante a desnaturação para além de ocorrer a quebra de ligações que se

estabelecem dentro da proteína (intramoleculares), também se estabelecem ligações entre moléculas (intermoleculares), o que induz a agregação das proteínas (Eissa *et al.*, 2006) (Fang e Dagleish, 1997) (Lefèvre e Subirade, 1999) (Allain *et al.*, 1999) (Byler e Purcell, 1989).

Pelo espectrofotómetro obtiveram-se espectros cujas bandas, pelo facto de estarem muito próximas umas das outras tiveram de ser separadas primeiramente por tratamentos matemáticos, como é o caso da desconvolução, realizada com recurso ao programa PeakFit (Lefèvre e Subirade, 1999). Através dos resultados obtidos a partir da janela de 2800-3100 cm^{-1} concluímos que não há consistência nem na deslocação do espectro nem nos valores das áreas relativas, ou seja, não há um comportamento tendência nem aquando da aplicação de calor, nem com o acerto de pH, e portanto não podemos fazer uma generalização do efeito destas duas variáveis estudadas. Para além disso, não se sabe a que corresponde cada banda uma vez que não existe na literatura uma atribuição feita a cada uma delas, tornando difícil a recolha de informação do espectro, tal como identificado por Eissa *et al.* (2006). Os mesmos autores concluíram também que nesta gama não havia alteração considerável do espectro após o aquecimento (Eissa *et al.*, 2006). Referem ainda que outros autores observaram uma diminuição da área de uma banda a 2940 cm^{-1} (Eissa *et al.*, 2006) (Bouraoui *et al.*, 1997). Porém, mencionam que, noutra publicação se observou exactamente o contrário, ou seja, que há aumento da área dessa mesma banda, embora se tenha usado maiores concentrações de proteína e também maior temperatura de aquecimento (Eissa *et al.*, 2006) (Howell *et al.*, 1999). Deste modo Eissa *et al.* (2006) concluíram que este assunto é ainda controverso e que é possível que esta banda a 2940 cm^{-1} não seja apenas função da desnaturação proteica, mas que seja afetada por outras interações da proteína. No presente caso, nunca surge esta banda mencionada a 2940 cm^{-1} , tal como sucedeu a Eissa *et al.*, 2006.

Por estas razões, não serão apresentados os resultados obtidos nesta janela.

Já os espectros referentes à janela 1600-1700 cm^{-1} foram desconvoluídos com base nas bandas também apresentadas no artigo de Eissa *et al.* (2006). Obteve-se o valor do pico de cada banda (cm^{-1}) e, de acordo com a Figura 3.1., fez-se uma correspondência com algumas das diferentes estruturas secundárias que podem surgir numa proteína. O esquema representado na Figura 3.1. foi construído com base em várias referências (Eissa *et al.*, 2006) (Fang e Dagleish, 1997) (Lefèvre e Subirade, 1999) (Kong e Yu, 2007) (Byler e Susi, 1986) (Allain *et al.*, 1999).

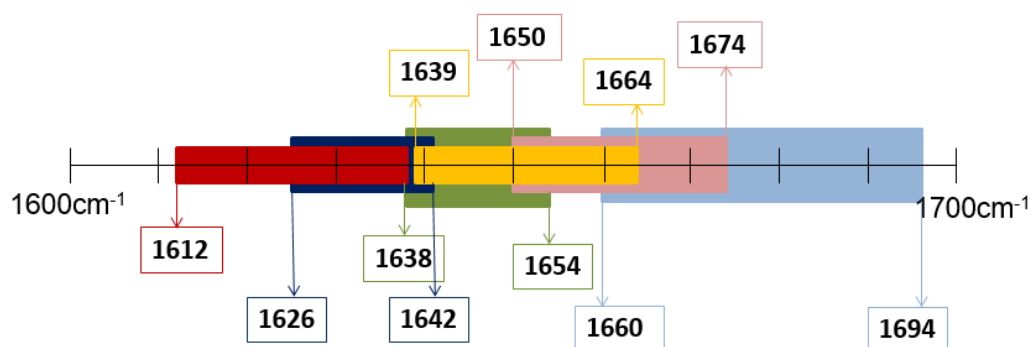


Figura 3.1. Regiões de energia (cm^{-1}) atribuídas às diferentes estruturas secundárias das proteínas. A vermelho escuro e claro estão representadas as folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo e as *random coil* a verde.

Os dados, para as cinco condições testadas, encontram-se apresentados nas Figuras 3.2., 3.3., 3.4., 3.5. e 3.6..

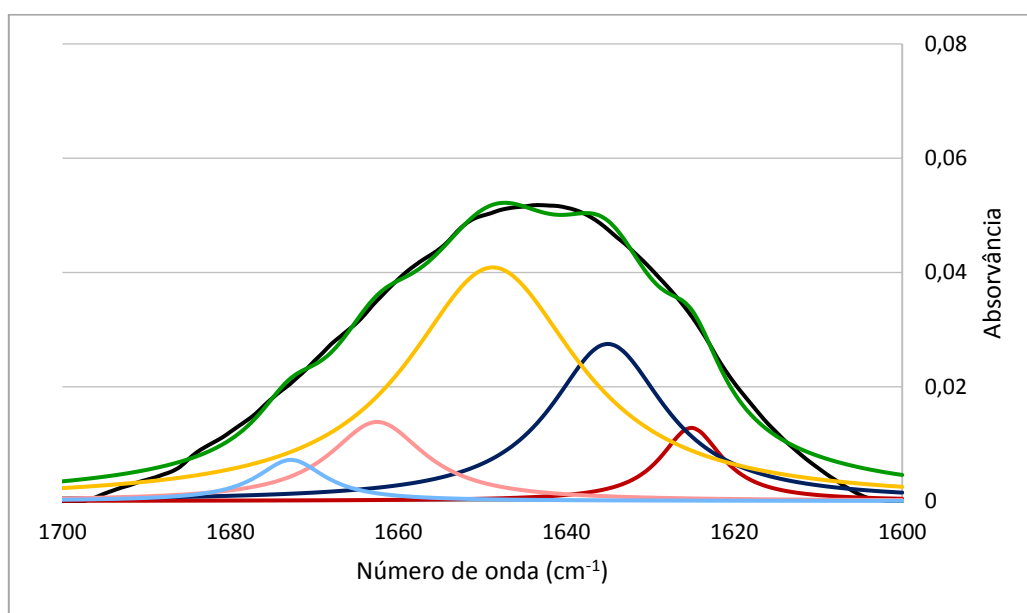


Figura 3.2. Espectro desconvolvido do soro comercial na condição em que a amostra não foi sujeita a nenhum tratamento (i), na janela $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$. A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvolvido. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.

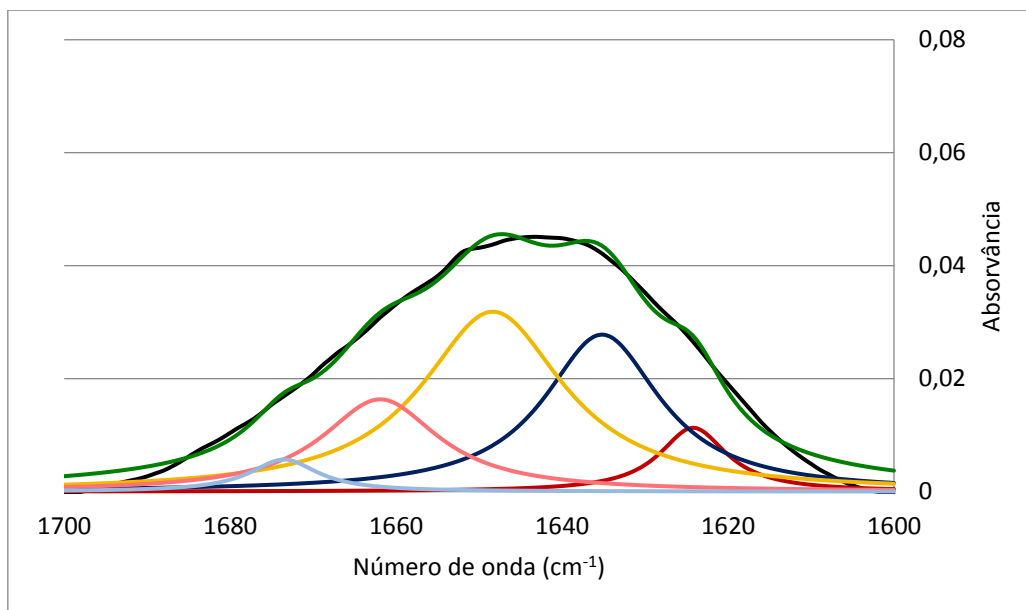


Figura 3.3. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em que a amostra foi apenas sujeita a certo de pH (ii), na janela 1700-1600 cm^{-1} . A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.

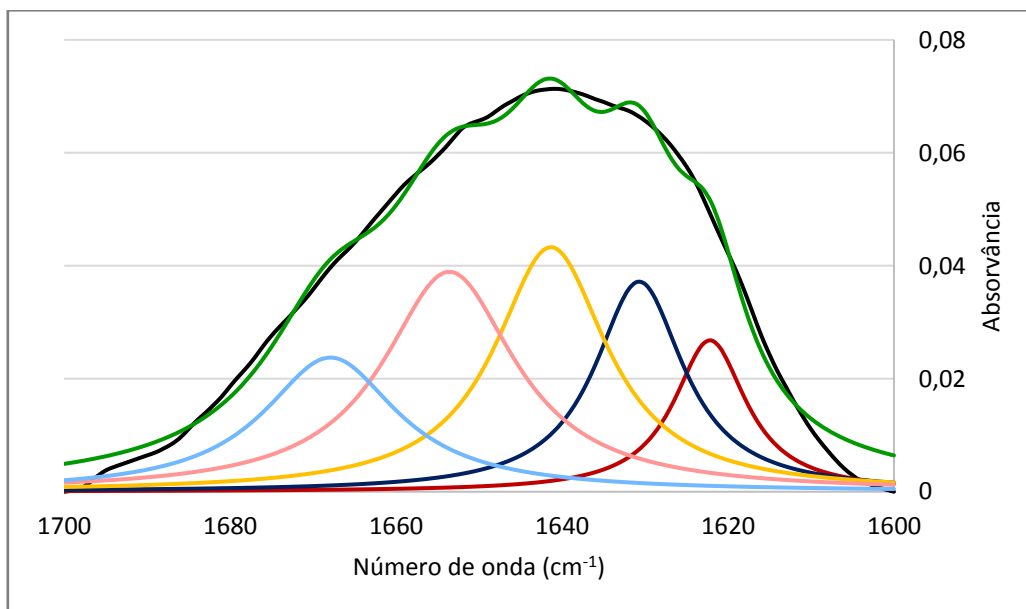


Figura 3.4. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em que a amostra foi apenas sujeita a aquecimento (iii), na janela 1700-1600 cm^{-1} . A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.

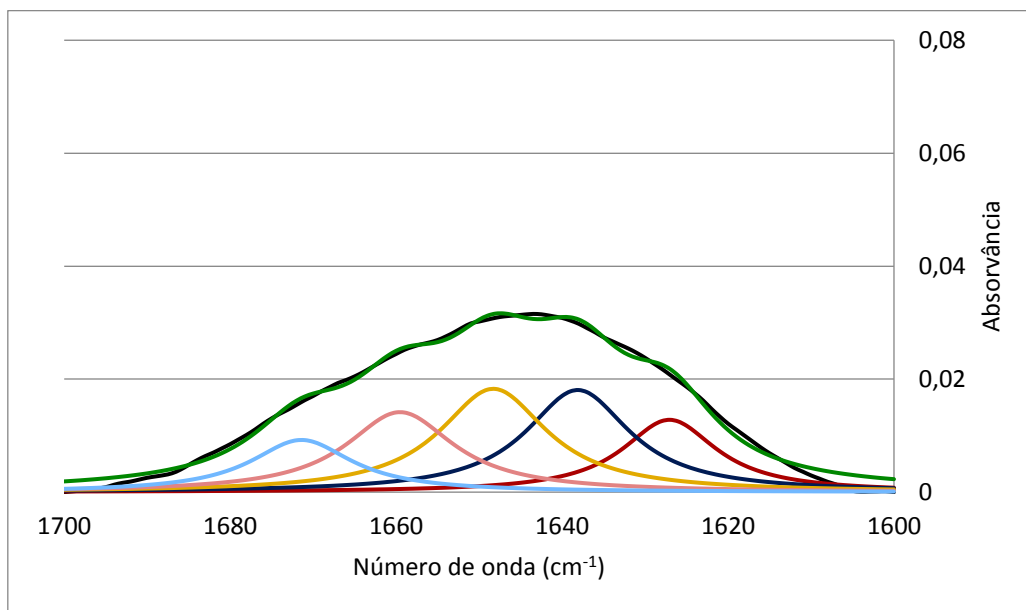


Figura 3.5. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em a amostra foi sujeita a um acerto de pH e posteriormente ao aquecimento (iv), na janela 1700-1600 cm^{-1} . A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.

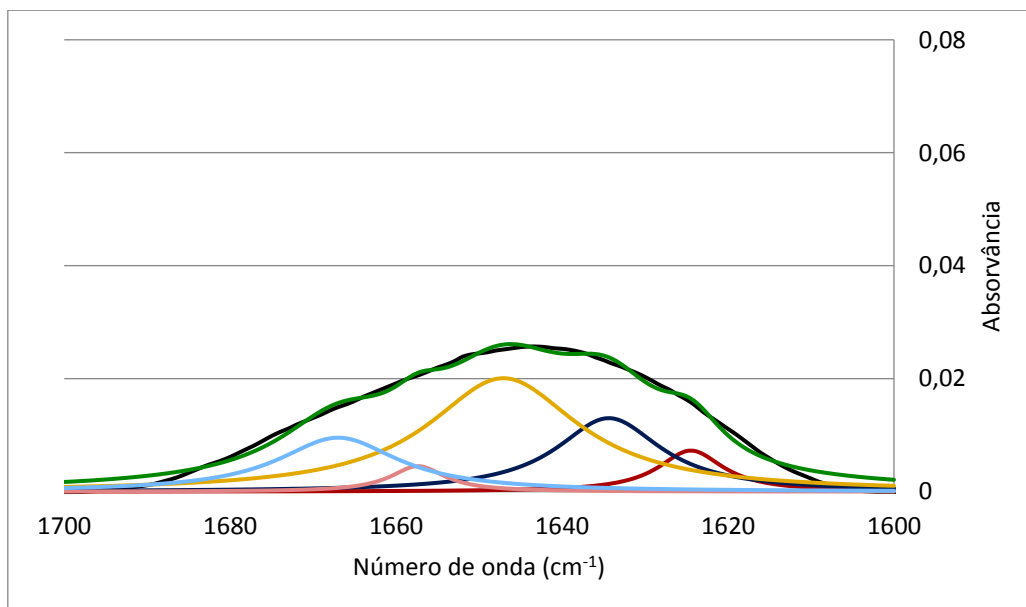


Figura 3.6. Espectro desconvoluído do soro comercial na condição em a amostra foi sujeita a um aquecimento e posteriormente ao acerto de pH (v), na janela 1700-1600 cm^{-1} . A preto está representado o espectro observado e a verde o espectro desconvoluído. As bandas a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. Já as bandas referentes às folhas- β intramoleculares surgem em tons de azul, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.

Tendo amostras nestas cinco condições diferentes, então para se poder fazer uma generalização acerca dos efeitos do tratamento térmico e do acerto de pH a 7 tem de se fazer comparações entre os espectros. Há três aspectos que se podem ter em consideração: o deslocamento das bandas no espectro, que corresponde ao número de onda, a intensidade, que equivale aos valores da absorvância, e também a influência de cada estrutura secundária, dada pela percentagem da área analítica de cada banda. Este último ponto foi traduzido num gráfico de barras (Figura 3.7.), de modo a evidenciar e tornar mais perceptível esta diferença. Os valores exactos da percentagem de área de cada banda, para cada condição, estão apresentados sob a forma de tabela, em anexo.

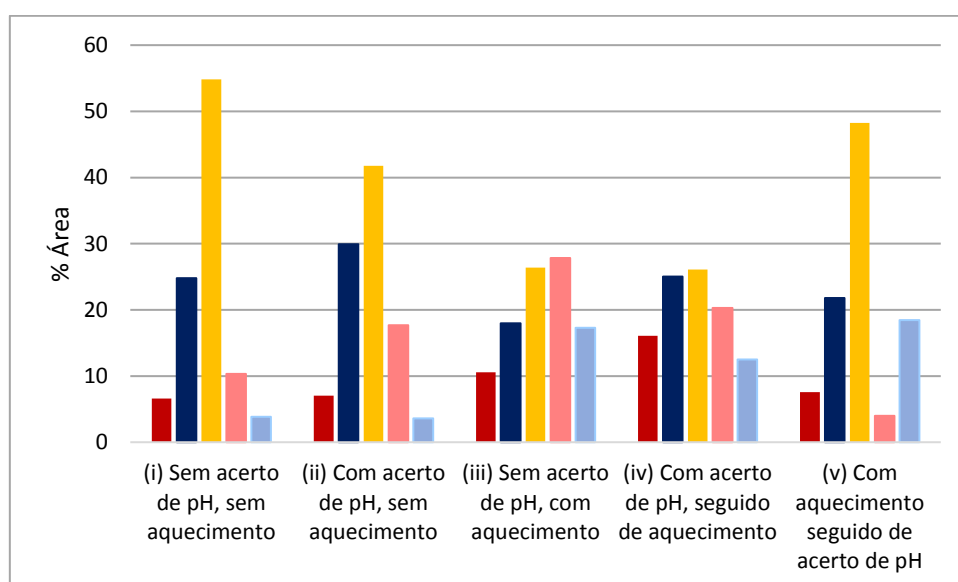


Figura 3.7. Áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nas 5 condições de pré-tratamento. As barras a vermelho escuro e claro correspondem às folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas, respectivamente. As barras a azul dizem respeito às folhas- β intramoleculares, sendo que o mais escuro é relativo às paralelas e o azul mais claro diz respeito às antiparalelas. As hélices- α são representadas a amarelo.

Começando pelo efeito do aquecimento, é necessário comparar as amostras que foram sujeitas a iguais condições de acerto de pH, e apenas se varia o factor aquecimento; assim, comparou-se: a condição em que não foi feito nenhum tratamento (i) com a condição em que apenas se fez aquecimento (iii), e a condição em que apenas se acertou o pH (ii) com a condição em que se fez primeiro um acerto de pH seguido de aquecimento (iv).

Na primeira comparação mencionada (i com iii, Figuras 3.2. e 3.4., respectivamente) verifica-se que o aquecimento provoca um deslocamento das bandas do espectro para a

direita (há uma diminuição do valor de energia) e também um aumento de intensidade (aumento dos valores de absorvância). Observando a Figura 3.7. é possível constatar uma diminuição da influência das folhas- β intramoleculares paralelas (1631 cm^{-1}) e das hélices- α (1641 cm^{-1}). Regista-se um aumento das folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas (1622 e 1653 cm^{-1} , respectivamente) e um aumento das folhas- β intramoleculares antiparalelas (1667 cm^{-1}).

Comparando (ii) com (iv) (Figuras 3.3. e 3.5., respectivamente) verifica-se que com aquecimento há um ligeiro deslocamento das bandas do espectro para a esquerda (há um aumento do valor de energia) e uma diminuição de intensidade (diminuição dos valores de absorvância). Isto não está de acordo com o observado na comparação anterior, pelo que nos leva a concluir que estes dados não são indicativos das alterações provocadas pelo aquecimento, e portanto não são significativos. Observa-se uma diminuição da influência das folhas- β intramoleculares paralelas (1638 cm^{-1}) e das hélices- α (1648 cm^{-1}). Verifica-se um aumento da influência das folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas (1627 e 1659 cm^{-1} , respectivamente) e das folhas- β intramoleculares antiparalelas (1671 cm^{-1}) (Figura 3.6.). Tal como já se tinha verificado anteriormente (na comparação de (i) com (iii)).

De facto, de acordo com a literatura, o aquecimento de proteínas provoca profundas alterações na região amida I do espectro de FTIR (Eissa *et al.*, 2006) (Byler e Purcell, 1989). É referida a diminuição da influência das hélices- α , também observada neste estudo, já que o aquecimento provoca a quebra de estruturas secundárias, o que significa que há perda da estrutura nativa, por outras palavras há desnaturação (Eissa *et al.*, 2006). Outra alteração, à qual a literatura dá um maior relevo, é o aumento da influência das folhas- β intermoleculares (Eissa *et al.*, 2006) (Byler e Purcell, 1989) (Fang e Dalglish, 1997) (Fang e Dalglish, 1998) (Lefèvre e Subirade, 1999) (Allain *et al.*, 1999). A explicação para tal suceder prende-se com o facto das estruturas desnaturadas pelo calor se agruparem e estabelecerem entre si ligações diferentes das que se observavam antes do aquecimento, formando agregados (Eissa *et al.*, 2006) (Fang e Dalglish, 1997) (Lefèvre e Subirade, 1999) (Allain *et al.*, 1999). Fang e Dalglish, 1997 sugerem ainda que caso haja um arrefecimento posterior (como aconteceu neste trabalho já que as amostras foram sempre congeladas) a possibilidade de formação destas novas folhas- β intermoleculares é ainda maior. Todos os autores mencionados também referem um aumento de uma banda a 1982 cm^{-1} que pode corresponder às folhas β intramoleculares antiparalelas, o que também se registou neste trabalho.

A desnaturação também implica a quebra de ligações intramoleculares. Para verificar se tal aconteceu fez-se a soma das percentagens de área analíticas dos dois tipos de folhas- β

intramoleculares – paralelas e antiparalelas. Procedeu-se de modo idêntico para as folhas- β intermoleculares. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.8.

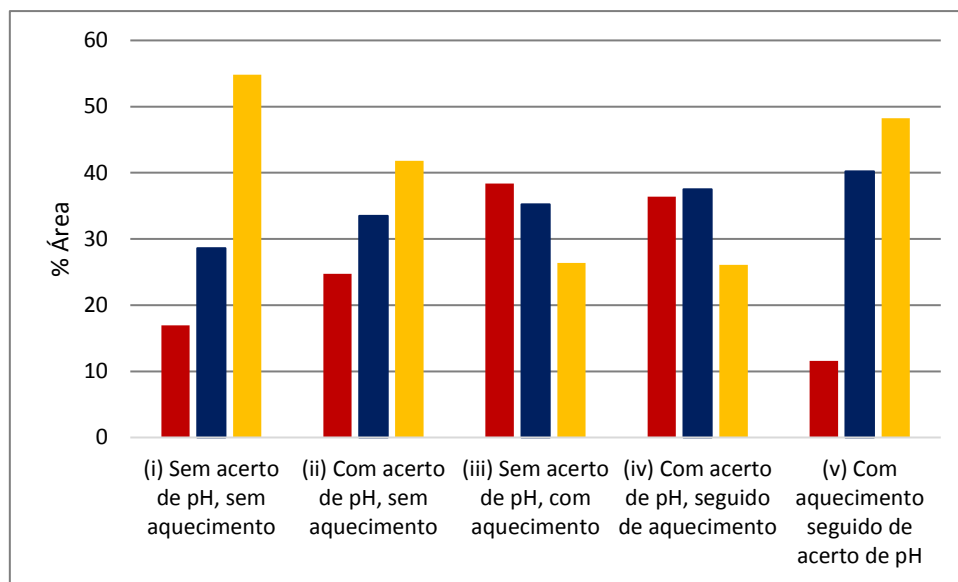


Figura 3.8. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nas 5 condições de pré-tratamento. As barras a vermelho correspondem às folhas- β intermoleculares, as azuis dizem respeito às folhas- β intramoleculares. As hélices- α são representadas a amarelo.

Observa-se um aumento da área total das folhas- β intramoleculares com o aquecimento, o que é contrário ao apontado pela literatura (Eissa *et al.*, 2006) (Fang e Dalgleish, 1997) (Fang e Dalgleish, 1998) (Lefèvre e Subirade, 1999) (Allain *et al.*, 1999). Ainda assim a área total das folhas β intermoleculares é superior à área total das intramoleculares (em (iii)), o que significa que estas últimas têm menor influência e portanto prova que há desnaturação causada pelo tratamento térmico.

Quanto ao efeito do acerto de pH a 7, tem de se comparar as amostras que foram sujeitas a iguais condições de aquecimento, e apenas se varia o factor pH; assim, comparou-se: a condição em que não foi feito nenhum tratamento (i) com a condição em que apenas se fez acerto de pH a 7(ii), a condição em que apenas se fez aquecimento (iii) com a condição em que se fez primeiro um acerto de pH seguido de aquecimento (iv) e com a condição em que o acerto de pH foi posterior ao aquecimento (v).

Comparando então (i) com (ii) (Figuras 3.2. e 3.3., respectivamente) observa-se um ligeiro deslocamento da curva para a direita (há uma diminuição do valor de energia) e uma diminuição de intensidade (diminuição dos valores de absorvância). Na Figura 3.7. é visível o

aumento da influência das folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas (1626 e 1660 cm^{-1} , respectivamente) e das folhas- β intramoleculares paralelas (1637 cm^{-1}). Há uma diminuição da influência das hélices- α (1649 cm^{-1}) e das folhas- β intramoleculares antiparalelas (1672 cm^{-1}).

Entre as condições (iii) e (iv) (Figuras 3.4. e 3.5., respectivamente) verifica-se que o acerto de pH provoca um ligeiro deslocamento da curva para a esquerda (há um aumento do valor de energia) e uma diminuição de intensidade (diminuição dos valores de absorvância). É ainda possível concluir, sobretudo pela Figura 3.7., que existe um aumento da influência das folhas- β intermoleculares paralelas (1627 cm^{-1}) e das folhas- β intramoleculares paralelas (1638 cm^{-1}). Por outro lado há uma diminuição da influência das hélices- α (1648 cm^{-1}), das folhas- β intermoleculares antiparalelas (1659 cm^{-1}) e das folhas- β intramoleculares antiparalelas (1671 cm^{-1}).

Finalmente, comparando as Figuras 3.4. e 3.6., que equivalem aos espectros das condições (iii) e (v), respectivamente, nota-se que com o acerto de pH há um deslocamento da curva para a esquerda e uma diminuição de intensidade. Já na Figura 3.7. é visível um aumento da influência das folhas- β intramoleculares paralelas (1636 cm^{-1}), das hélices- α (1648 cm^{-1}) e folhas- β intramoleculares antiparalelas (1665 cm^{-1}). Há uma diminuição da influência das folhas- β intermoleculares paralelas e antiparalelas (1626 e 1659 cm^{-1} , respectivamente).

Assim, há consistência nas diferenças observadas no deslocamento do espectro (que de uma forma geral se dá para valores de número de onda maiores), e também para os valores de absorvância, que diminuem. Contudo, na literatura nada é referido acerca destas alterações nos espectros, sendo por isso difícil retirar conclusões a partir destes dados. Mais uma vez é nas alterações ao nível da influência de cada estrutura que as publicações focam a sua atenção (Eissa *et al.*, 2006) (Fang e Dalgleish, 1997) (Lefèvre e Subirade, 1999) (Allain *et al.*, 1999).

O pH do meio pode levar à mudança do estado de ionização de resíduos de aminoácidos das cadeias laterais das proteínas e como consequência as interações entre as cadeias vão ser diferentes, reflectindo-se em alterações conformacionais. Tem portanto implicações na estabilidade da estrutura nativa das proteínas (Allain *et al.*, 1999) (Fang e Dalgleish, 1997) (Fang e Dalgleish, 1998). A pH inferior a 7 há um desdobramento parcial da proteína, o que significa que há perda de algumas estruturas secundárias (Allain *et al.*, 1999). De facto, é possível constatar pela Figura 3.7. que na condição (i), em que o pH se situa por volta de 6,26, há menos folhas- β (intra e intermoleculares) do que na condição (ii) em que o pH é 7.

Outra situação é quando há também associado um aquecimento. Sabe-se que a β -lactoglobulina é mais resistente à desnaturação térmica a pH ácido (devido às alterações estruturais explicadas no parágrafo anterior), sendo necessário temperaturas mais elevadas

para quebrar a estrutura proteica (Fang e Dalglish, 1997) (Lefèvre e Subirade, 1999). Allain *et al.*, 2006 observaram que nesta situação há uma manutenção da estrutura parcialmente desdobrada adquirida o que confere estabilidade térmica, e justifica com a presença de ligações intermoleculares, que são em número suficiente para manter essa estabilidade, ao mesmo tempo que se mantêm ainda bastantes ligações dentro da molécula. Efectivamente observamos na Figura 3.8. que na condição (iii), em que há aquecimento mas o pH não foi acertado, e é portanto inferior a 7, há influência ligeiramente maior das folhas- β intermoleculares, mas há um valor aproximado de folhas- β intramoleculares. O mesmo já não sucede na condição em que o pH é 7 antes do aquecimento, (iv). Neste caso a proteína apresenta-se na forma nativa e por isso há mais ligações intramoleculares, como se observa. Por outro lado, Casal *et al.* (1988) e Boye *et al.* (1996) demonstraram que apesar da alteração conformacional da proteína, o total de folhas- β (somatório das intermoleculares com as intramoleculares) permanece constante, o que também é registado no presente estudo. Também as hélices- α vêm reforçar estes resultados, uma vez que na condição (iv) há uma ligeira diminuição da sua percentagem de área analítica, o que aponta para uma maior desnaturação.

Uma situação diferente surge quando o acerto de pH é posterior à aplicação do tratamento térmico (condição (v)). Por conseguinte, à partida, há de facto diferenças entre fazer o acerto de pH antes e depois do aquecimento. Comparando directamente as condições (iv) e (v) isto torna-se mais claro.

Na condição (v) o pH da amostra antes do aquecimento é inferior a 7, e portanto é esperado uma maior resistência à desnaturação, quando comparado com (iv). Prevê-se então que o aquecimento não provoque tanta desnaturação, havendo muito menos quebra das ligações intramoleculares e que se formem menos novas ligações intermoleculares. Pela Figura 3.8. verifica-se o espectável. Em (v) a área total das folhas- β intramoleculares é muito superior à área total das folhas- β intermoleculares. O resultado obtido para as hélices- α também é concordante com esta ideia, uma vez que há um aumento da sua influência, o que é sinal de não ter havido tanta desnaturação proteica.

Existe outro aspecto que é igualmente importante frisar. Tanto na condição (iii) como na (v) o pH do meio no momento da aplicação de calor é idêntico e inferior a 7. Para além disso, o resultado final também é semelhante na medida em que há menos desnaturação. Contudo não se observam comportamentos iguais, isto é, a influência de cada tipo de estrutura não se assemelha. Na condição (v) há mais folhas- β intramoleculares e hélices- α e sobretudo há muito menos folhas- β intermoleculares, do que em (iii). Isto leva-nos a concluir que o acerto

final do pH também tem alguma influência no grau de desnaturação, tornando-a ainda menos eficaz do que no caso em que não há qualquer acerto.

No entanto, o acerto do pH a 7 depois do aquecimento permite garantir que, mais tarde, quando se adiciona a transglutminase, o pH do meio está efectivamente a 7, que é o pH óptimo de actuação da enzima. Isto porque na condição em que o acerto de pH a 7 é feito previamente, ao medir o pH no fim do aquecimento verificou-se que este voltou a baixar para um valor próximo do inicial. Uma explicação para tal suceder pode ser o facto das temperaturas elevadas provocarem quebra de ligações de hidrogénio, podendo haver um aumento da concentração de protões H^+ no meio, por reacções de hidrólise, e consequentemente o pH torna-se mais ácido.

Na literatura esta diferença nunca é investigada; o acerto de pH é sempre feito em primeiro lugar (Eissa *et al.*, 2006) (Monahan *et al.*, 1995) (Dissanayake *et al.*, 2013) (Moro *et al.*, 2011) (Schokker *et al.*, 2000) (Schokker *et al.*, 1999). Contudo, utilizam sempre como matriz de estudo ou concentrado ou isolado (β -lactoglobulina pura) proteico. De facto isto foi comprovado por Aguiar (2017) que comparou estas duas condições para a β -lactoglobulina pura. Fazendo o acerto de pH em primeiro lugar, verificou que após o aquecimento este não se altera, e daí que no final, para a proteína purificada, as duas condições se revelem idênticas. Já para o soro o mesmo não acontece o que pode estar por exemplo relacionado com o facto de se tratar de uma mistura complexa. O soro comercial tem como base o concentrado e isolado proteico mas também lhe são adicionados outros ingredientes como por exemplo emulsionantes, espessantes, edulcorantes, aromatizantes e corantes. Quanto ao soro de queijo (que também será utilizado), apesar de não ter estes aditivos, também contém água, lactose e outros constituintes minoritários, como a gordura e sais minerais. E por isso é expectável que deste ponto de vista os dois tipos de soro usados se comportem de forma mais ou menos semelhante.

Em suma, através da análise dos dados obtidos por FTIR, observámos alterações estruturais das proteínas do soro resultantes do aquecimento, ou seja, houve desnaturação térmica, que era o que se pretendia com a aplicação deste tratamento. O mesmo foi já observado também para outras proteínas (Lefèvre e Subirade, 1999) (Allain *et al.*, 1999).

Quanto ao efeito do pH, podemos concluir que: individualmente o acerto a pH 7 confere uma maior estabilidade à estrutura nativa das proteínas; se não houver acerto de pH, o efeito desnaturante do aquecimento não é tão pronunciado; quando há acerto de pH a 7 e ele é feito antes do aquecimento, verifica-se uma melhoria da eficácia do efeito desnaturação; se o acerto fôr só posterior ao aquecimento ocorre exactamente o oposto, havendo uma atenuação da desnaturação.

Contudo, não convém esquecer que o acerto de pH é feito com o intuito de que aquando da adição da transglutaminase o pH do meio seja 7. Ora isto apenas se verifica para a condição (v), na qual o referido acerto é só feito no final.

Assim sendo, apesar da condição (iv) satisfazer melhor a necessidade da desnaturação, a condição (v) é mais favorável à pré-condição do pH do meio ser 7.

Para confirmar todas as conclusões inferidas, foram depois também realizadas outras duas técnicas - electroforese SDS-PAGE e determinação de diversas fracções proteicas pela metodologia de Kuchroo e Fox.

Pela electroforese SDS-PAGE das amostras nas 5 condições de acerto de pH e aquecimento obtiveram-se dois géis, que estão representados na Figura 3.9.

Verifica-se também o efeito da adição do agente redutor β -mercaptoetanol (β -Me) em cada caso. Este composto actua quebrando ligações dissulfídicas o que nos permitirá saber que tipos de ligações mantém os diversos agregados proteicos (Dissanayake *et al.*, 2013) (Jovanovic *et al.*, 2007) (Schokker *et al.*, 2000) (Monahan *et al.*, 1995) (Schokker *et al.*, 1999).

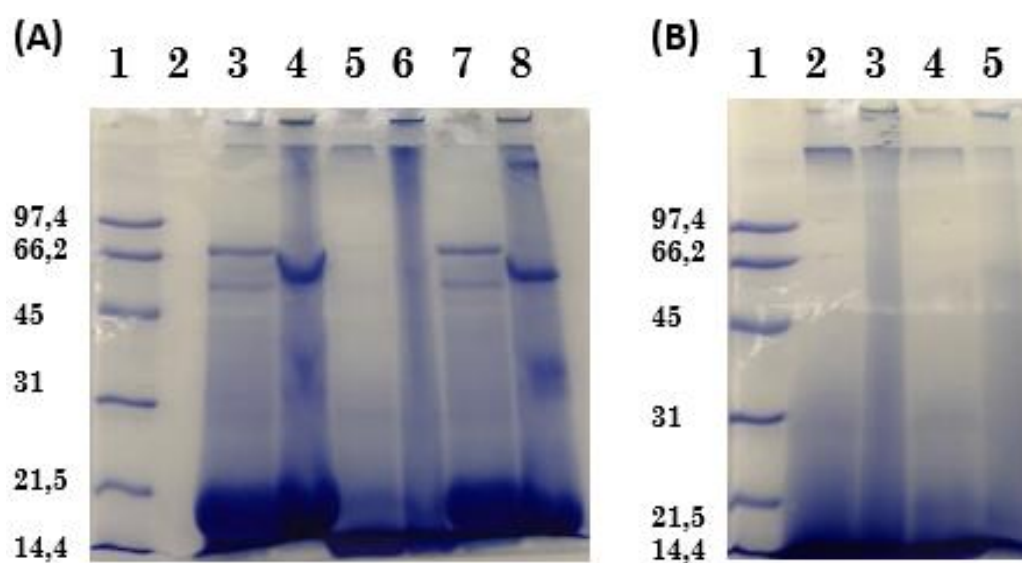


Figura 3.9. Gel de poliacrilamida a 12%, com as 5 condições de pré-tratamento. **(A) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: sem acerto de pH, sem aquecimento; poços 5 e 6: sem acerto de pH, com aquecimento; poços 7 e 8: com acerto de pH, sem aquecimento. **(B) Os poços 2 e 4 têm adição de β -Me e os poços 3 e 5 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poços 2 e 3: com acerto de pH seguido de aquecimento; poços 4 e 5: com aquecimento seguido de acerto de pH.

Na condição em que a amostra não foi sujeita a nenhum tratamento e não houve adição de β -Me (Figura 3.9. A, poço 4), verifica-se a existência de uma mancha intensa no fundo do gel que corresponde aos monómeros da α -lactoalbumina (α -La) (14,18 kDa) e da β -

lactoglobulina (β -Lg) (18,4 kDa) (Monahn *et al.*, 1995) (Jovanovic *et al.*, 2007). No gel não é possível distinguir duas bandas diferentes uma vez que os seus pesos moleculares são relativamente aproximados e sobretudo porque existe uma grande quantidade de ambas as proteínas no soro comercial (juntas representam cerca de 70% do conteúdo proteico deste produto), daí que as bandas se sobreponham. É possível observar uma banda a aproximadamente 55 kDa que poderá equivaler a tetrâmeros de α -La (56,72 kDa) ou a trimeros de β -Lg (55,2 kDa). Também há uma banda no topo do gel e até é visível uma mancha mesmo no poço. Tal facto pode ser explicado com a existência de proteínas que apresentam pesos moleculares mais elevados, como por exemplo imunoglobulinas (aproximadamente 144 kDa) (Monahn *et al.*, 1995). Também poderam ser agregados proteicos, dímeros da lactoperoxidase ou da lactoferrina (aproximadamente 155 kDa e 160 kDa, respectivamente), que são outras proteínas minoritárias do soro; ou então agregados entre as várias proteínas do soro. O facto de ficarem retidas no poço pode significar que o peso molecular era tão elevado que não conseguiram entrar no gel. Relativamente à amostra na mesma condição, mas à qual foi adicionada o agente redutor (Figura 3.9. A, poço 3), observa-se algo um pouco diferente. A mancha intensa no fundo do gel, correspondente aos monómeros da α -La e da β -Lg, mantém-se. Contudo há uma diminuição significativa das bandas do topo do gel o que indica que o agente redutor quebrou os agregados proteicos, e que estes eram mantidos por ligações dissulfureto intermoleculares (Monahn *et al.*, 1995). Verifica-se também um menor arrastamento ao longo de toda a corrida. De facto um olhar mais atento repara que, em comparação com este caso, é possível observar no poço descrito anteriormente (Figura 3.9. A, poço 4) a presença de uma mancha um pouco mais evidente, embora ténue, entre os 45 e os 25 kDa, tal como Moro *et al.*, 2011 observaram. Nesta região surgem dímeros de β -Lg e de α -La (36,8 kDa e 28 kDa, respectivamente), e dímeros formados pelas duas proteínas (Monahn *et al.*, 1995). Ainda assim, estas bandas são muito ténues o que revela uma presença muito reduzida no soro. Também é visível o aparecimento de uma banda a cerca de 66,2 kDa que pode corresponder à albumina do soro (BSA), outra proteína do soro, e que resulta da clivagem dos agregados (Monahn *et al.*, 1995). Este perfil de SDS-PAGE descrito está de acordo com o encontrado por outros autores que também analisaram soro concentrado comercial (Clare e Daubert, 2010).

Quando a amostra é apenas sujeita ao aquecimento, e sem presença de β -Me (Figura 3.9. A, poço 6), observa-se a mancha no fundo do gel, correspondente aos monómeros de α -La e da β -Lg. No entanto, em comparação com a condição anterior, em que não há aquecimento, constata-se que a referida mancha tem uma notória quebra de intensidade o que pode ser explicado com o facto do aquecimento provocar a perda de estrutura nativa, e assim sendo

ambas as proteínas já não estão na forma monomérica nativa, o que também foi registado por Moro *et al.*, 2011 e por Schokker *et al.*, quer no estudo de 1999 como também no do ano seguinte. Também na zona dos dímeros de α -La e da β -Lg há uma ligeira diminuição do arrastamento, uma vez que o aquecimento provoca quebra destes agregados proteicos existentes. No entanto não desaparece totalmente. Pela mesma razão se poderia prever que desaparecesse a banda do topo do gel. No entanto isto não se verifica; a banda no topo do gel continua presente. Como já foi anteriormente explicado, depois da desnaturação térmica há uma tendência para que se estabeleçam novas ligações intermoleculares, formando-se assim novos agregados. E daí também se continuar a observar algum arrastamento das bandas, que equivale a estes novos agregados proteicos que podem ter vários tamanhos (Monahan *et al.*, 1995) (Dissanayake *et al.*, 2013). Já no caso em que foi adicionado β -Me (Figura 3.9. A, poço 5), tal como já tinha sido observado na condição anterior, e comum também ao registado por Dissanayake *et al.*, 2013, há uma diminuição do arrastamento e da banda do topo do gel, demonstrando que estes novos agregados formados pela desnaturação também são mantidos por ligações dissulfídicas.

Quando se faz apenas acerto de pH a 7 (Figura 3.9. A, poço 8) verificam-se as bandas do topo e do fundo do gel, e a banda a cerca de 55 kDa. Este perfil de SDS-Page é muito semelhante ao observado no poço 4 em que o pH é inferior. Contudo, é de salientar duas ligeiras diferenças. A mancha ténue que surge na zona dos dímeros da α -La e da β -Lg, comum ao indicado no estudo de Moro *et al.*, 2011, e que é um pouco mais visível aqui do que na amostra sem qualquer tratamento; acompanhada com uma menor intensidade da banda a 55 kDa correspondente a tetrâmeros de α -La e trímeros de β -Lg. A explicação para tal pode ser a maior estabilidade das estruturas proteicas nativas a pH 7 do que a a pH inferior a este valor (que se regista no soro antes do acerto), já justificada na parte referente à análise do FTIR. Neste caso β -Lg existe principalmente na forma dimérica (Schokker *et al.*, 2000). No poço 7 (Figura 3.9. A) observam-se os mesmos efeitos já atribuídos ao agente redutor, na medida em que, mais uma vez tal como na condição (i), se voltam a registar o desaparecimento da banda do topo do gel, o menor arrastamento e o aparecimento de uma banda a cerca de 66 kDa (BSA) (Schokker *et al.*, 2000) (Monahan *et al.*, 1995).

Na condição com acerto de pH a 7 seguido de aquecimento, no poço 3 (Figura 3.9. B) está presente a banda do fundo do gel equivalente aos monómeros das duas proteínas maioritárias. Porém esta tem menos intensidade comparativamente às do poço 8 e do 6, o que também foi publicado noutros artigos (Schokker *et al.*, 2000) (Schokker *et al.*, 1999) (Moro *et al.*, 2011). Verifica-se um menor arrastamento quando comparada com o poço 6, da Figura 3.9. A, no qual a amostra tinha sido apenas submetida ao aquecimento, embora não desaparece

totalmente uma vez que se formam novos agregados de tamanho médio, como registaram os mesmos autores mencionados. Tudo isto comprova a melhoria na desnaturação causada pelo aquecimento, também apontada pela análise de FTIR. Está também presente a banda do topo do gel e no próprio poço que equivalem aos novos agregados proteicos de alto peso molecular, formados depois da desnaturação térmica das proteínas e agregados pré-existentes (Schokker *et al.*, 2000). Porém esta banda apresenta menor intensidade do que a do poço 6, levando a crer que a formação de novos agregados se deu em menor quantidade, o que portanto parece contradizer a conclusão da melhoria da desnaturação. Contudo a literatura refere que os agregados formados pela desnaturação podem chegar a valores de tão elevado peso molecular que deixam de ser solúveis. Assim deixa de ser possível pipetá-los e portanto não chegam sequer a ser carregados no poço (Damodaran e Agyare, 2013) (Schokker *et al.*, 2000).

Já no poço 2 (Figura 3.9. B), no qual foi carregada a amostra nesta condição mas com a presença de agente redutor, regista-se uma diminuição do arrastamento causada pela quebra de ligações dissulfídicas entre agregados. O que também justifica o desaparecimento da retenção de amostra no poço. No entanto, permanece uma banda no topo do gel porque por um lado pode haver tantas ligações dissulfídicas, resultante do facto de haver muita agregação, que a quantidade de β -Me não foi suficiente para quebrar todas elas; por outro lado porque há outro tipo de ligações que mantém os agregados, para além das dissulfídicas que são as principais (Schokker *et al.*, 1999).

Na última condição em estudo, em que o acerto de pH só é efectuado depois do aquecimento (poço 5, Figura 3.9. B), observa-se a banda no fundo do gel que equivale aos monómeros da α -La e da β -Lg, e uma banda no topo do gel que revela a presença de agregados (Dissanayake *et al.*, 2013). Porém esta última banda é um pouco menos intensa do que a banda correspondente do poço 3 (Figura 3.9., B) o que nos leva a deduzir que há menos desnaturação térmica e por isso menos agregação. Isto é confirmado quando se analisa o poço 4 da mesma figura, no qual está presente o agente redutor. Aqui encontra-se uma banda no topo do gel, tal como se tinha observado no poço 2 correspondente à condição em que o acerto de pH é anterior. Porém, desta vez a intensidade dessa banda é muito inferior o que vem reforçar a ideia de que o acerto de pH posterior à aplicação do tratamento térmico torna a desnaturação causada por este menos eficiente. Também, mais uma vez, se observa um ligeiro aumento da intensidade da banda do fundo do gel e um ainda menor arrastamento, como resultado da quebra das ligações dissulfídicas existentes nos agregados.

Assim sendo, da análise deste géis conclui-se que o tratamento térmico aplicado resultou efectivamente numa desnaturação das proteínas e que há, seguidamente, formação de novos agregados que se estabelecem sobretudo por ligações dissulfídicas.

Mais uma vez se voltou a confirmar que o acerto de pH a 7 confere estabilidade à estrutura nativa das proteínas, na medida em que quando é feito sem aquecimento provoca um aumento da intensidade de certas bandas (dímeros de α -La e β -Lg), face à situação na qual não é feito.

Quanto ao efeito do acerto do pH juntamente com o tratamento térmico, verifica-se que caso o referido acerto seja feito em primeiro lugar há uma melhoria do efeito desnaturante do aquecimento. Pelo contrário, caso o acerto seja posterior observa-se menos desnaturação.

Tudo isto é concordante com o que foi concluído pela análise dos resultados de FTIR.

Seguidamente, na Figura 3.10., são apresentados os resultados obtidos pela última técnica utilizada – a metodologia de Kuchroo e Fox – que não é comum a artigos nos quais se fez estudos semelhantes aos deste trabalho.

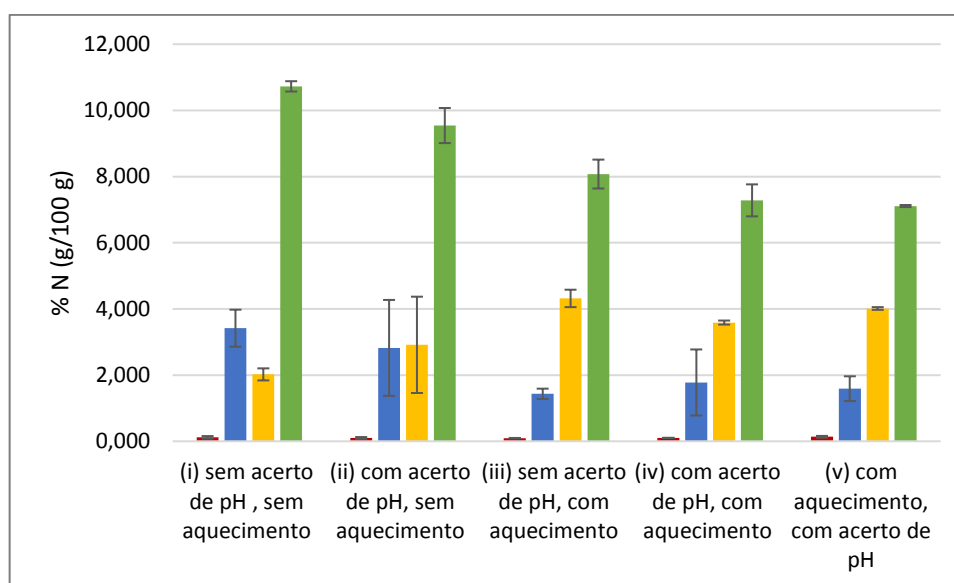


Figura 3.10. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o soro comercial 10% nas 5 condições de pré-tratamento. A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal.

A análise destes resultados será feita pela comparação de todas as fracções numa mesma condição, e também pela diferença entre fracções iguais para condições diferentes.

As várias fracções de azoto têm diferentes conteúdos proteicos. O azoto solúvel em água (WTC) corresponde às proteínas pequenas, péptidos longos, médios e curtos, resíduos de aminoácidos e amoníaco, ou seja, difere do azoto total (que aqui não foi determinado) pelo simples facto de não serem contabilizadas as proteínas grandes (Kuchroo e Fox, 1982). No que diz respeito ao azoto total não se estudou esta fracção para cada condição; esta fracção permite determinar o conteúdo proteico total, que foi 76 g/100g, o que corresponde ao indicado pelo rótulo da embalagem de soro comercial em pó. O azoto não proteico (TCASN) equivale aos péptidos médios e curtos, resíduos de aminoácidos e amoníaco; a fracção de azoto aminoacídico (PTASN) possui péptidos curtos, resíduos de aminoácidos e amoníaco; por último na fracção de azoto amoníacal apenas se encontra amoníaco (Soares, 2013) (Cunha, 2015).

Deste modo é possível estabelecer que os teores de azoto terão de ser sempre mais elevados na fracção WTC, seguidos da fracção TCASN/PTASN, e os valores inferiores corresponderão sempre ao azoto amoníacal. Isto é o que se observa efectivamente para todas as condições.

Com o aquecimento verifica-se uma diminuição da fracção de WTC uma vez que ocorre desnaturação das proteínas do soro e portanto há uma redução do teor de proteínas pequenas e péptidos longos. Já para os péptidos médios e curtos o mesmo não se verifica. Pelo contrário, há até um aumento do valor da fracção de TCASN com o aquecimento. Associado à desnaturação segue-se a agregação dos compostos que daí resultaram, constituindo novos péptidos curtos e médios. O aquecimento reduz a quantidade de péptidos curtos e resíduos de aminoácidos, avaliada pelo PTASN, indicando também, que na desnaturação, há agregação dos compostos resultantes, mas sob a forma de péptidos médios.

Relativamente ao efeito do acerto de pH a 7 juntamente com o tratamento térmico, volta a ser plausível retirar conclusões idênticas às que foram deduzidas pelos resultados do FTIR e da electroforese SDS-PAGE. Primeiro que o acerto de pH aumenta o efeito desnaturante do aquecimento, o que pode ser inferido pela redução que se observa na fracção de azoto solúvel em água, das condições (iv) e (v) face às condições (ii) e (iii). Comparativamente à condição (iii), há uma redução da fracção TCASN, havendo também menos péptidos de tamanho médio, e um aumento da fracção PTASN, ou seja mais péptidos de tamanho curto.

Os resultados obtidos pelas três técnicas são concordantes. Os resultados das duas últimas técnicas validam assim as conclusões retiradas a partir dos dados obtidos por FTIR, que também estavam em conformidade com a literatura. Esta técnica sai corroborada mostrando ser de facto útil para ser usada para este fim.

Também se conclui que terão que ser testadas ambas as condições em que há tanto acerto de pH a 7 como aquecimento, só que por diferentes ordens. Só com a adição da transglutaminase será possível concluir qual é de facto a melhor condição de pré-tratamento a ser aplicada às amostras de soro, para uma melhor actuação da enzima. Assim sendo, seguidamente, nos primeiros estudos em que se adiciona a enzima (quer no soro comercial, quer depois também para o soro de queijo) são sempre utilizadas amostras nas duas condições referidas.

3.1.2. Optimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento

Depois de cumprido o pré-requisito de suficiente exposição dos resíduos de aminoácidos glutamina e lisina do substrato proteico através da aplicação de tratamento térmico, pode-se então passar à fase da reticulação enzimática pela transglutaminase (TG). Para que esta reacção seja totalmente eficaz é necessário definir três aspectos fundamentais: temperatura e tempo de reacção, e quantidade de enzima adicionada.

No que diz respeito a esta última condição, o valor mais consensual para ser utilizado é 50 U de TG por grama de proteína, e por isso foi esta a concentração escolhida inicialmente para ser usada (Eissa *et al.*, 2006) (Gauche *et al.*, 2008) (Gauche *et al.*, 2010).

Contudo, Aguiar (2017) verificou no seu estudo que se estavam a formar poucos polímeros resultantes da reticulação uma vez que a banda no topo do gel (equivalente a esses polímeros) tinha pouco intensidade. Por isso concluiu-se que talvez a quantidade de TG usada não estivesse a ser a mais adequada para o nível de polimerização desejado.

Por esta razão decidiu-se otimizar a quantidade de TG testando valores mais elevados (e não inferiores, como acontece nalguma literatura e também apontados como eficazes) (Eissa *et al.*, 2004) (Villas-Boas *et al.*, 2010) (Villas-Boas *et al.*, 2012) (Truong *et al.*, 2004). Para além dos 50 U de TG por grama de proteína experimentou-se 100 U g⁻¹ proteína, 150 U g⁻¹ proteína, 200 U g⁻¹ proteína, 250 U g⁻¹ proteína, 400 U g⁻¹ proteína, 500 U g⁻¹ proteína, 600 U g⁻¹ proteína, e também 1000 U g⁻¹ proteína. Logo numa primeira fase fez-se uma avaliação visual na qual se excluiu esta última dose uma vez que apresentava uma cor muito mais intensa que todas as outras doses testadas e era um pouco mais viscosa, o que não é desejado uma vez que queremos que o produto final seja solúvel e o mais atractivo possível para o consumidor. Para além disso pode causar problemas no processamento para transformação novamente em pó, caso isso seja pretendido (Jong e Koppelman, 2002). De entre todas as restantes concentrações, e de acordo com os resultados visuais observados, foram seleccionadas cinco:

com o mínimo a ser 50 U g⁻¹ e o máximo 600 U g⁻¹, e as concentrações intermédias alternadas entre si, isto é, escolheram-se a 100 U g⁻¹, 200 U g⁻¹ e 400 U g⁻¹. Foram estas as concentrações que foram submetidas a uma análise posterior, mais rigorosa, pelas três técnicas usadas ao longo de todo este trabalho.

Este estudo foi realizado em amostras sujeitas àquelas que foram consideradas na secção anterior (3.1.1.) as duas melhores condições de pré-tratamento: a (iv) com acerto de pH a 7 seguido de aquecimento, uma vez que a desnaturação térmica é melhorada, e a (v) em que os tratamentos são feitos pela ordem inversa, na medida em que garante que no final o pH do meio é efectivamente o mais adequado à actuação da enzima TG. Na restante literatura revista onde se utiliza a TG, a ordem de acerto do pH não é avaliada; o acerto de pH é sempre feito em primeiro lugar, tal como indicado por vários autores (e.g. Bagheru *et al.*, 2014 e outros referenciados na tabela 1.2).

As amostras obtidas, em ambas as pré-condições referidas, e com as cinco concentrações diferentes de TG, foram analisadas por FTIR. Pretende-se verificar se esta técnica pode ser utilizada como um método fiável para o acompanhamento da reticulação das proteínas do soro pela TG. Para creditação recorreu-se novamente à electroforese SDS-PAGE e à metodologia de Kuchroo e Fox.

Quanto ao FTIR tiraram-se espectros das amostra em duas janelas diferentes- 1600-1700 cm⁻¹ e 2800-3100 cm⁻¹ – já mencionadas na secção 3.1.1. Esta última gama referida voltou-se a usar apesar do que já tinha sido concluído na secção anterior. Isto porque depois da adição de TG Eissa *et al.* (2006) registaram mudanças no espectro desta região: as bandas a 2935 cm⁻¹ e a 2901 cm⁻¹ sofre um desvio para 2934 cm⁻¹ e para 2898 cm⁻¹, respectivamente; para além disso ambas as bandas vêem aumentadas as suas áreas relativas. Os autores indicam que isto estará relacionado com o rearranjo dos aminoácidos alifáticos que ocorre como resultado da nova agregação provocada pela acção da TG, e que leva a alterações nas interações hidrofóbicas. Também a reacção do aminoácido lisina pode levar a estas alterações. Noutro artigo é indicado que mudanças na banda a 2960 cm⁻¹ também reflectem estes acontecimentos (Bagheri *et al.*, 2014). Porém nenhuma delas foi alguma vez verificada neste trabalho. Inicialmente pensava-se que até poderia estar relacionado com o facto de se estar a usar uma dose de enzima reduzida; mas depois nem nas concentrações mais elevadas estas alterações foram observadas. Juntando a isto o facto de nestes dois artigos em que se usa o FTIR para análise da reticulação pela TG (Eissa *et al.*, 2006) (Bagheri *et al.*, 2014) darem mais ênfase aos resultados obtidos na outra região espectral (região Amida I), foi decidido que não se apresentariam estes resultados e sobretudo que, daqui em diante, não seria necessário

voltar a analisar amostras na gama 2800-3100 cm^{-1} ; passou-se apenas a recolher espectros da região Amida I (1600-1700 cm^{-1}).

Os espectros obtidos foram desconvoluídos e analisados. Ao longo da secção anterior (3.1.1.), mais especificamente na parte relativa à análise por FTIR, foram sendo constatados alguns aspectos acerca da análise dos resultados, mais concretamente dos espectros, obtidos por essa técnica. Dessa análise, é possível concluir que é a partir da percentagem de área analítica das bandas correspondentes a cada tipo de estrutura secundária que se pode tirar mais informação. O deslocamento do gráfico e os valores da absorvância não dão informação pertinente, principalmente porque a literatura não lhes faz referência. Por isso estes dois últimos factores não vão voltar a ser analisados. Torna-se assim desnecessária a apresentação dos espectros desconvoluídos, pelo que daqui em diante os mesmos não serão apresentados.

Os valores dos números de onda das bandas correspondentes a cada tipo de estrutura secundária e as respectivas percentagens de área analítica estão apresentados na forma de tabelas (em anexo). Foram também convertidas para gráficos, que estão representados nas Figuras 3.11. e 3.12., sendo que o primeiro diz respeito ao efeito da adição de TG (50 U g^{-1}) e o segundo ao estudo principal desta secção.

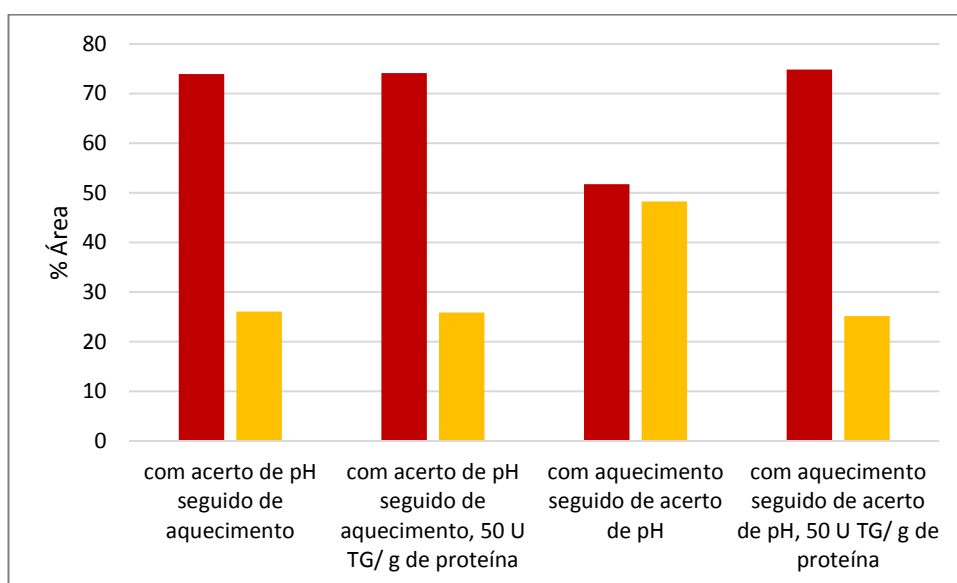


Figura 3.11. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nas 2 condições de pré-tratamento seleccionadas, sem e com adição da enzima TG. As barras a vermelho correspondem às folhas-β e as hélices-α são representadas a amarelo.

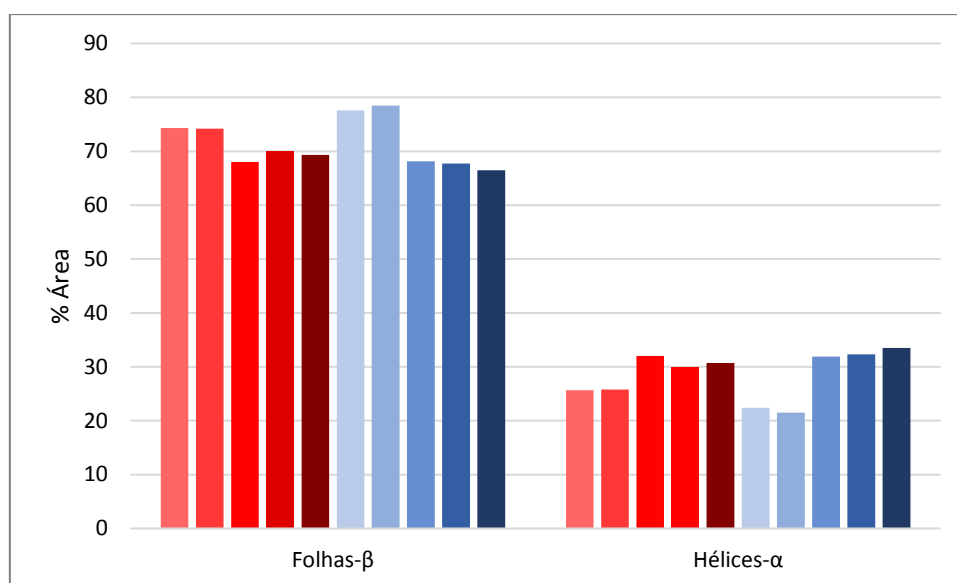


Figura 3.12. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} . As barras a vermelho correspondem à condição (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento e as azuis à (v) com aquecimento seguido de acerto de pH. A gradação das cores do mais claro para o mais escuro é indicativo do respectivo aumento da quantidade de TG adicionada (50-600 U g^{-1}).

Resultados apresentados na literatura indicam que há apenas ligeiras diferenças na região do espectro referente à amida I em amostras unicamente desnaturadas termicamente e aquelas com adição de TG. Isto é atribuído ao baixo número de ligações criadas que digam respeito à cadeia central das proteínas (Eissa *et al.*, 2006). Ainda assim, os autores referem que a reação de reticulação altera o microambiente que rodeia o grupo carbonilo da cadeia lateral da glutamina que reage com a lisina (Eissa *et al.*, 2006). Explicando mais pormenorizadamente: a TG catalisa a formação de ligações ϵ -(γ -glutamil)lisina que podem ser intra ou intermoleculares no caso dos aminoácidos de lisina e glutamina serem na mesma molécula ou em moléculas diferentes, respectivamente (Eissa *et al.*, 2005). Isto permite a aproximação de átomos de hidrogénio dentro e entre moléculas, aumentando assim a probabilidade do estabelecimento de novas ligações de hidrogénio também elas intra ou intermoleculares. Isto conduz eventualmente à reorganização das estruturas secundárias das proteínas e portanto esperar-se-ia ver um aumento da influência das folhas- β , tanto intra como intermoleculares (Eissa *et al.*, 2005) (Eissa *et al.*, 2006). Por esta razão nestes dois gráficos (Figuras 3.11. e 3.12.) só é apresentado o somatório das folhas- β ; não se especifica a percentagem de área analítica de cada tipo de folha- β existente (intra e intermoleculares, paralelas e antiparalelas), como aconteceu na secção anterior.

Esta dedução é confirmada pela Figura 3.11., pois efectivamente observa-se que a adição de TG se traduz no aumento da percentagem de área analítica das folhas- β , sendo mais evidente na condição em que o tratamento térmico é efectuado *a priori*, seguido do acerto de pH. Embora sem diferenças significativas, é na condição com aquecimento, seguido de acerto de pH e adição de TG que se obtém maior percentagem de área analítica das folhas- β .

O mesmo já não se pode dizer das hélices- α ; nesta condição óptima para o aumento da percentagem de área analítica das folhas- β , verifica-se que quando se adiciona TG há uma redução da percentagem de área analítica das hélices- α . Contudo esta diminuição após a reticulação enzimática já foi notada e descrita por Eissa et al. (2006), que justifica com o facto de na hélice- α da β -Lg estarem presentes dois resíduos de lisina, que ao reagirem levam à perda dessa estrutura organizada. Por outro lado, Bagheri et al. (2014), com base nos espectros de FTIR obtidos, apontam que a reticulação não tem qualquer efeito nesta estrutura secundária.

Portanto, o aumento de folhas- β pode ser utilizado como um indicador de reticulação induzida pela TG.

Passando ao objectivo concreto desta secção - seleccionar a melhor quantidade de TG para ser adicionada (Figura 3.12.). Para ambas as condições de pré-tratamento, verifica-se que os melhores resultados são obtidos quando se usa 50 e 100 U TG por grama de proteína, uma vez que apresentam maiores percentagens de área analítica para as folhas- β . A diferença entre ambas as concentrações é muito diminuta. Ainda assim para a condição (iv) (a vermelho) o valor é ligeiramente superior para a concentração mínima, enquanto que para (v) há um melhor resultado quando é usado o dobro desta concentração. Também para as duas condições se observa que quantidades superiores a 100 U g⁻¹ apresentam sempre piores resultados. Jong e Koppelman (2002) e (Nonaka *et al.*, 1994) afirmam que há um patamar a partir do qual a reticulação passa a ser excessiva. De uma forma mais esclarecedora: concentrações demasiado elevadas de TG reduzem a formação de polímeros uniformes e estáveis; e verifica-se, experimentalmente, uma diminuição da solubilidade das amostras que não permite uma correcta amostragem e análise. Comparando os pré-tratamentos, também se observa que o tratamento (v) permite a obtenção de melhores resultados. Do estudo, verifica-se que o melhor resultado foi obtido com a adição de 100 U TG g⁻¹, e pré-tratamento (v).

O géis de electroforese SDS-PAGE onde se correram estas amostras estão representados na Figura 3.13-3.14., relativa ao pré-tratamento (iv) e(v), respectivamente.

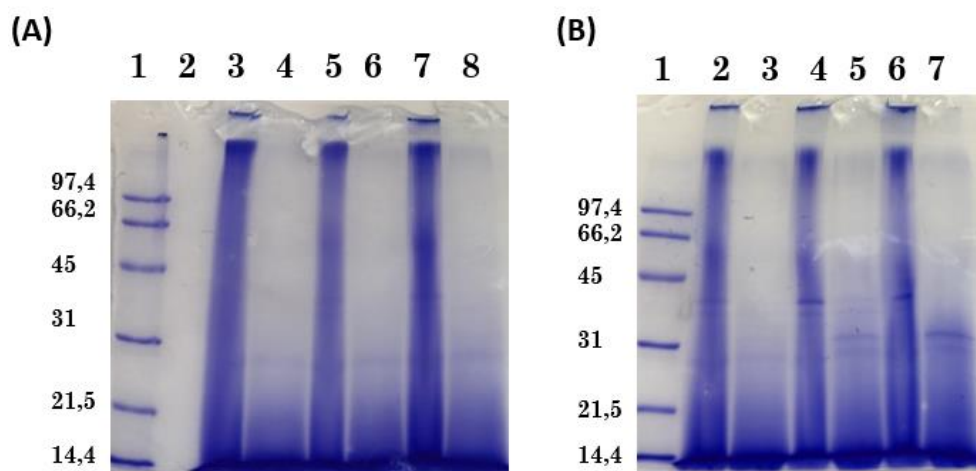


Figura 3.13. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (iv) com acerto de pH a 7, seguido de aquecimento, e com várias quantidades de TG adicionadas. **(A) Os poços 4, 6 e 8 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína. **(B) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 2, 4 e 6 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2 e 3: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína; poços 4 e 5: adição de 400 U TG g⁻¹ de proteína; poços 6 e 7: adição de 600 U TG g⁻¹ de proteína.

Em primeiro lugar, pode-se começar por comparar o poço 3 da Figura 3.13. A com o poço 3 da Figura 3.9. B, da secção 3.1.1., que dizem respeito a amostras com pré-tratamentos idênticos, mas com e sem adição de TG, respectivamente. Verifica-se que no da Figura 3.13. A que a intensidade da banda no topo do gel, equivalente a polímeros de alto peso molecular, e o arrastamento, indicativo de polímeros de mais baixo e variados pesos moleculares, é muito superior ao registado no poço mencionado da outra Figura, onde não estava presente a enzima. Também a retenção de polímeros nos poços, devido ao facto de terem pesos moleculares tão elevados que nem conseguem entrar no gel de separação, é muito mais notória. Tudo isto está de acordo com o descrito por vários autores (Eissa *et al.*, 2004) (Eissa *et al.*, 2005) (Villas-Boas *et al.*, 2010) (Villas-Boas *et al.*, 2012) (Damodaran e Agyare, 2013) (Zhong *et al.*, 2013).

No entanto o mesmo já não pode ser dito para os poços com amostras às quais foi adicionado o agente redutor β -Me. De acordo com a literatura, o uso deste composto serve para verificar se de facto ocorreu ou não reticulação. A TG catalisa a formação de ligações ϵ -(γ -glutamil)lisina que não são quebradas pelo β -Me (apenas actua sobre as ligações dissulfídicas). Isto permite distinguir agregados proteicos resultantes da reticulação pela TG, de outros agregados que possam existir (os formados pela desnaturação ou pré-existentes na solução inicial, sem qualquer tratamento) (Eissa *et al.*, 2004) (Eissa *et al.*, 2005). Analisando nos géis representados os poços com β -Me, verifica-se que face aos que não têm este composto, há

um total desaparecimento da banda do topo do gel e da mancha nos poços, e também do arrastamento, o que indica que estas bandas equivaliam a agregados mantidos por ligações dissulfícas e não polímeros resultantes da reticulação pela enzima TG. Tudo isto nos pode levar a crer e a concluir que pode não ter ocorrido reticulação. No entanto, pode ter ocorrido reticulação e os agregados resultantes serem de dimensões tais que deixam de ser solúveis, não tendo sido carregados nos poços. De facto Jong e Koppelman (2002) referem que a electroforese SDS-PAGE para análise da reticulação pela TG é limitada, isto é, que a partir de certo grau de reticulação esta técnica deixa de ser exacta e precisa. Isto é reforçado pelo facto de não serem observadas (Figura 3.13. A e B) diferenças entre as várias concentrações de TG usadas. Esta técnica é portanto pouco sensível.

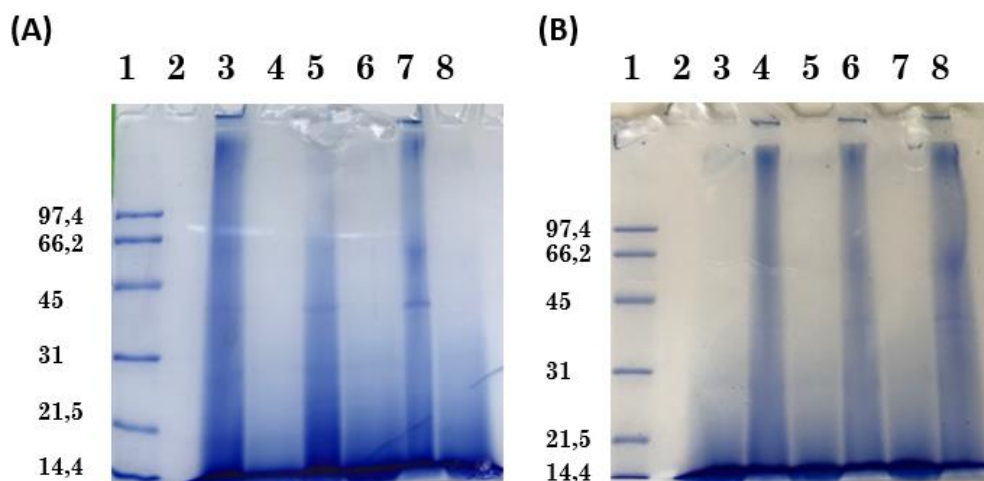


Figura 3.14. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (v) com aquecimento seguido de acerto de pH a 7, e com várias quantidades de TG adicionadas. . **(A) Os poços 4, 6 e 8 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína. **(B) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 400 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 600 U TG g⁻¹ de proteína.

Na Figura 3.14., referente ao estudo da optimização da quantidade de TG a adicionar mas com as amostras preparadas com a condição (v), é possível constatar algo similar. Comparativamente ao estudo realizado nas amostras preparadas na outra condição (Fig. 3.13), verifica-se apenas que nos poços sem β -Me há menos arrastamento e as bandas do topo são menos intensas; em particular no poço 5 da Figura 3.14. A a banda do topo não existe mesmo.

As desvantagens apontadas para a técnica de SDS-PAGE realçam a ideia da utilidade em ter outra técnica mais precisa, exacta e sensível para seguir a reticulação. O FTIR é uma

alternativa viável na medida em que através dessa técnica se alcançou resultados que permitiam diferenciar as várias concentrações testadas.

Quanto à metodologia de Kuchroo e Fox os resultados das diferentes fracções proteicas encontram-se na Figura 3.15. É importante referir que nesta técnica apenas se confrontou as duas concentrações: 50 e 400 U TG g⁻¹. Optou-se por estudar, a par de uma concentração óptima (50 U TG g⁻¹), uma concentração de TG que fosse muito superior à óptima para avaliar diferenças.

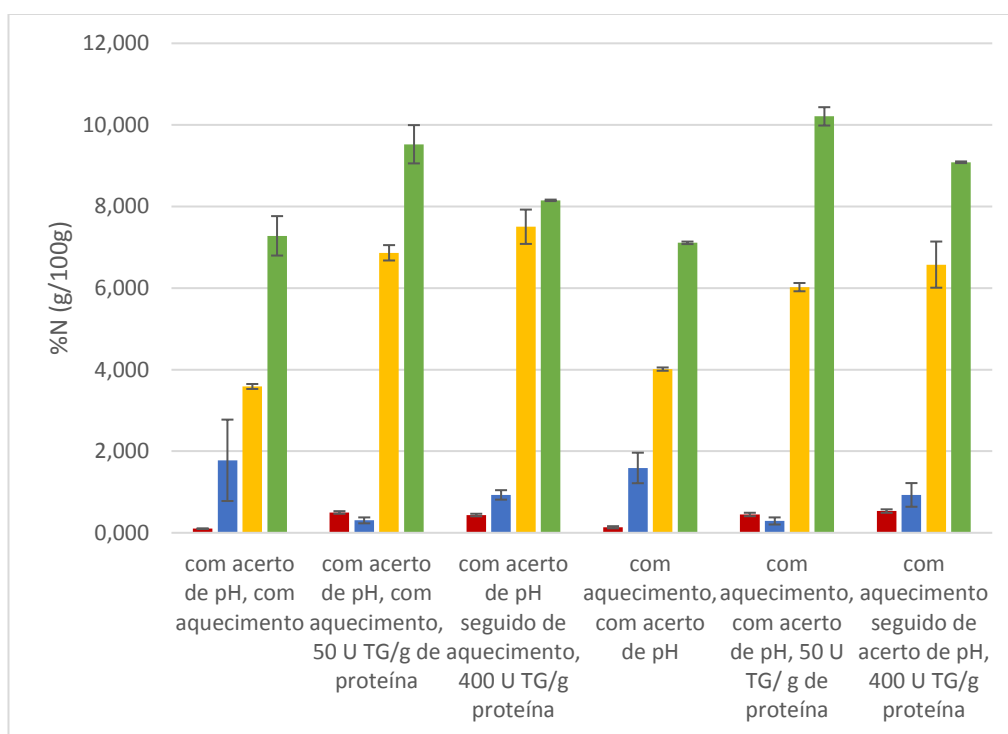


Figura 3.15. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o amostras preparadas nas duas melhores condições de pré-tratamento, (iv) e (v), e com a adição de adição de diversas quantidades de TG. A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal.

Para ambas as condições de pré-tratamento, verifica-se que quando se adiciona a enzima TG há um aumento das fracções WTC e TCASN e uma diminuição da fracção PTASN. Isto significa que com a adição de TG há uma maior quantidade de pequenas proteínas e péptidos longos e médios, e que compostos de tamanho mais reduzido deixam de ter tanta expressão; este resultado corrobora o fato da enzima TG induzir a formação de agregados proteicos, e estes podem ter várias dimensões, mostrando a reticulação desejada.

A fracção de azoto amoniacal (Figura 3.15., a vermelho) é constituída exclusivamente por amoníaco, observando-se um aumento pela adição de TG. Este aumento resulta da

reação de reticulação catalisada pela TG que conduz à libertação de uma molécula de NH_3 (Figura 1.2., secção 1.3.). Por isso, Jong e Koppelman (2002) apontam a produção de amoníaco como uma técnica alternativa e útil para seguir a reticulação; fornece dados mais quantitativos e continua a revelar-se informativa mesmo quando a análise por SDS-PAGE o deixa de ser.

Quando se utiliza uma concentração de TG mais elevada (400 U g^{-1}), em ambas as condições de pré-tratamento, regista-se uma diminuição da fracção WTC, um ligeiro aumento na TCASN e um aumento um pouco mais evidente do PTASN, face aos resultados obtidos com 50 U g^{-1} . Isto indica-nos que há uma menor quantidade de proteínas pequenas e péptidos longos. Significa, portanto, que pode ter ocorrido a reticulação de proteínas de pequena dimensão e se tenham formado proteínas de dimensão elevada, as quais não são passíveis de serem determinadas por esta metodologia. Por outro lado há um aumento da quantidade de péptidos médios, e também de péptidos curtos, o que significa que a TG, nesta dose, não promoveu a aglomeração dos péptidos de pequena dimensão. No que diz respeito ao azoto amoniacal não há grande alteração do seu valor o que indica que a TG continua a actuar. A presença de menos compostos de maior peso molecular comprova mais uma vez o que já foi referido: que concentrações demasiado elevadas de TG reduzem a formação de polímeros uniformes e estáveis. Entre pré-tratamentos, (iv) e (v), verifica-se que se obtêm valores da fracção WTC superiores com o pré-tratamento (v), com aquecimento seguido de acerto de pH, seguido da adição de 50 U g^{-1} de TG. A utilização de doses reduzidas de TG ($50\text{-}100 \text{ U g}^{-1}$) permite a obtenção de compostos de maior peso molecular, nomeadamente proteínas pequenas, sugerindo a reticulação desejada.

Com base nos resultados que foram apresentados e discutidos podemos concluir que, para o soro comercial, se deve fazer um pré-tratamento começando pelo aquecimento e só depois passar ao acerto de pH. Também que menores quantidades de TG conduzem a uma reticulação mais adequada sendo que, na condição de pré-tratamento referida, a melhor concentração é 100 U g^{-1} proteína.

Conclui-se também que a técnica de SDS-PAGE apresenta algumas limitações, pelo que o FTIR assume um papel importante na verificação da acção da enzima TG.

3.2. Soro de queijo

3.2.1. Caracterização do soro de queijo

A caracterização do soro de queijo líquido é essencial para enquadrar possibilidades de valorização e a avaliação da sua estabilidade. Esta deve compreender os parâmetros de composição genéricos como a matéria seca, cinza, lípidos, proteína, e parâmetros de importância específica para produtos lácteos como o pH e a acidez titulável, e teor de minerais, nomeadamente cálcio, sódio e cloretos (Cunha, 2015) (Pelegrine e Carrasqueira, 2008) (Almeida *et al.*, 2001) (Bald *et al.*, 2014) (Carvalho *et al.*, 2013) (Oliveira *et al.*, 2008) (Lima *et al.*, 2014). A escolha dos métodos de análise assentou em métodos padronizados que, sendo vulgarmente utilizados, permitem a comparação com dados da literatura.

Os valores de pH e acidez, bem como os resultados obtidos pela análise macromolecular do soro de queijo estão compilados na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Caracterização do soro de queijo.

pH	4,98
Acidez (g ác. Láctico L ⁻¹)	1,51 ± 0,07
Matéria Seca (g L ⁻¹)	52,4 ± 0,6
Proteína (g L ⁻¹)	17,2 ± 0,7
Lípidos (g L ⁻¹)	2,29 ± 0,11
Cinza (g L ⁻¹)	3,91 ± 0,03
Açúcares (g L ⁻¹) ¹	29,0 ± 0,9 ²

¹ Valor calculado pela diferença de cinzas, lípidos e proteína em relação à matéria-seca.

² Erro calculado por propagação do desvio-padrão associado às restantes medições efectuadas.

O valor da acidez para um soro de queijo é normalmente próximo de 0,9 g L⁻¹ (em ácido láctico) (Johansen *et al.*, 2002), o que é mais baixo do que o resultado obtido neste trabalho. O valor de pH está um pouco afastado dos valores usuais de um soro de queijo que são mais elevados, rondando o pH 6,4 (Johansen *et al.*, 2002) (Bald *et al.*, 2014) (Lima *et al.*, 2014) (Teixeira e Fonseca, 2008) (Lira *et al.*, 2009); e é mais próximo do valor de pH de soro de iogurte (pH 4). A diferença entre o soro de queijo e iogurte é devida ao facto da coagulação do queijo não ser normalmente efectuada por abaixamento de pH como acontece para o iogurte,

mas antes por introdução de coagulantes (Bylund,1995). Contudo há excepções, há alguns tipos de queijo (por exemplo o queijo fresco) que são sujeitos ao referido abaixamento de pH e cujo soro resultante é classificado como soro ácido (Cunha, 2015) (Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005) (Panesar *et al.*, 2007). A acidez elevada e o pH baixo, indicam que o soro estudado era um soro ácido. Carvalho *et al.*, 2013 apresenta um intervalo de valores alargado que inclui pH mais ácidos (pH 3,8 – 6,5), que engloba o resultado aqui obtido. O valor de pH obtido é também diferente do soro comercial em pó anteriormente utilizado, que apresentava um valor para este parâmetro de 6,26.

Todos os outros valores apresentados na tabela 3.1. são relativamente consistentes com os dados obtidos por outros autores para soro de queijo (Johansen *et al.*, 2002) (Gallardo-Escamilla *et al.*, 2005).

O baixo teor de lípidos registado vai de encontro ao facto da maioria da gordura ficar retida no coágulo durante a produção do queijo. A gordura existente no leite encontra-se na forma de glóbulos que são partículas de grande dimensão e que têm baixa densidade, pelo que têm tendência a não passar no filtro de dessoramento e assim permanecem no coágulo (Cunha, 2015) (Bylund,1995). No entanto, este parâmetro é apontado como sendo o mais variável na constituição do soro uma vez que também é o mais variável na constituição do leite, sendo influenciado pela padronização ao qual é sujeito o leite, pelo processamento e pelo rendimento da produção de queijo (Lima *et al.*, 2014).

O valor da cinza diverge um pouco do intervalo 4,9-5,7 g L⁻¹ apresentado por Johansen *et al.* (2002), sendo que esta diferença também reflecte a influência do processamento, da origem do leite e do rendimento da produção de queijo (Lima *et al.*, 2014).

Em relação ao conteúdo proteico, o resultado obtido é muito superior ao resultado de 5,45 g L⁻¹ apresentado por Johansen *et al.* (2002) e 9 g L⁻¹ apresentado por Oliveira *et al.* (2008). Esta diferença está relacionada com o facto da composição do soro de leite bovino poder variar substancialmente dependendo da variedade de queijo produzido e do leite utilizado na produção do queijo. O tempo e a condição de preservação do soro desde o momento de produção até ao momento de análise também pode justificar variações entre os vários resultados encontrados (Bald *et al.*, 2014) (Penna *et al.*, 2009).

Desta forma, também o valor dos açúcares se desvia um pouco do normal para um soro de queijo (45,4-51,9 g L⁻¹) (Johansen *et al.*, 2002). Zall (1992) também refere que o teor de açúcares em soros ácidos (como o do estudo) é inferior ao de soros doces. Todo o açúcar presente consiste em lactose, ou os seus monómeros galactose e glucose (este último vestigial) (Cunha, 2015).

Quanto à análise das espécies minerais presentes no soro os valores obtidos estão apresentados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Resultados da análise dos elementos minerais do soro de queijo.

Fósforo (g L ⁻¹)	1,8 ± 0,5
Cloretos (g L ⁻¹)	0,125 ± 0,005
Sódio (g L ⁻¹)	0,53 ± 0,03
Potássio (g L ⁻¹)	1,7 ± 0,3
Cálcio (g L ⁻¹)	1,8 ± 0,4
Magnésio (g L ⁻¹)	0,22 ± 0,05
Ferro (mg L ⁻¹)	0,44 ± 0,09

O conteúdo de fósforo é cerca do dobro do relatado por Johansen *et al.* (2002) para um soro de queijo. Por outro lado aproxima-se do soro de iogurte (Cunha, 2015). Esta diferença pode estar relacionada com o facto do soro em utilização ser ácido. Alguns resultados obtidos distanciam-se muito dos encontrados na literatura, o que mais uma vez pode estar relacionado com as características do leite usado para a produção do queijo e de que tipo de queijo se trata (Bald *et al.*, 2014) (Penna *et al.*, 2009). Efectivamente a composição da cinza é um factor apontado como sendo o que apresenta mais variação entre diversos soros, e que também tem grande impacto já que influencia as propriedades funcionais do soro em questão (Cunha, 2015) (Bylund, 1995).

3.2.2. Análise do soro de queijo simples e nas duas melhores condições de pré-tratamento

Para o soro de queijo foram repetidos os estudos já feitos com o soro comercial devido ao facto das composições de ambos os tipos de soro serem ligeiramente diferentes. O principal componente – as proteínas – é comum entre os dois soros. No entanto, pelo que é indicado no rótulo da embalagem, o soro comercial também contém emulsionantes, espessantes, edulcorantes, aromatizantes e corantes. O soro de queijo não tem estes aditivos, mas contém água, lactose e outros constituintes minoritários, como a gordura e sais minerais. É por isso

expectável que, embora tenham comportamentos aproximados, possa haver ligeiras diferenças.

Quanto ao primeiro estudo, para soro de queijo foram apenas preparadas as duas últimas condições (iv) e (v) uma vez que ficou claro que é essencial o aquecimento a 80 °C durante 1 hora e o acerto de pH a 7, de modo a que o tratamento posterior com a TG seja mais eficaz.

Comparou-se o soro de queijo simples (sem aquecimento e sem acerto de pH) com o soro de queijo preparado nas duas condições referidas para avaliar o efeito do pré-tratamento. Também se tentou perceber se, no caso deste tipo de soro, alguma das condições de pré-tratamento se destacava logo à partida como sendo a melhor, confrontando-as directamente.

Os resultados que nos permitem tirar conclusões acerca deste assunto são apresentados na Figura 3.16. correspondente aos dados obtidos por análise dos espectros de FTIR na região amida I (espectros não apresentados), na Figura 3.17. gel de electroforese SDS-PAGE, e na Figura 3.18. que diz respeito às várias fracções de azotadas obtidas pelo método de Kuchroo e Fox.

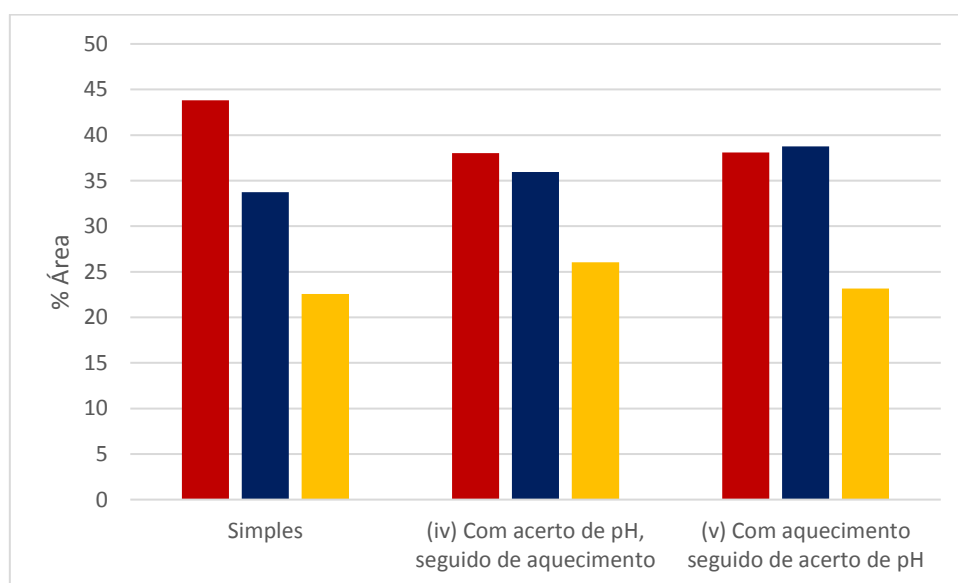


Figura 3.16. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , para o soro de queijo simples e preparado nas duas melhores condições – (iv) e (v). As barras a vermelho correspondem às folhas-β intermoleculares, as azuis dizem respeito às folhas-β intramoleculares. As hélices-α são representadas a amarelo.

Neste estudo o FTIR é utilizado apenas para analisar a porção proteica do soro de queijo embora esta técnica também possa ser utilizada para detectar outros compostos do soro

nomeadamente a gordura e a lactose. No entanto, estes não são passíveis de ser aqui detectados uma vez que as bandas características destes dois componentes se situam fora da região analisada (1600-1700 cm^{-1}). Os grupos hidroxilo da lactose absorvem aproximadamente a 1040 cm^{-1} . Quanto à gordura a banda mais característica é a 1747 cm^{-1} , correspondente à vibração dos grupos C=O (carbonilo), mas também absorve a 2874 cm^{-1} , que equivale à vibração dos grupos C-H (Voort, 1992) (Iñón *et al.*, 2004) (Voort, 1993). Há ainda referência a uma outra banda a 2927 cm^{-1} , que também diz respeito a este último tipo de vibração mencionada (Voort, 1992).

Comparando o soro de queijo no seu estado natural com amostras de soro de queijo preparado nas duas condições de pré-tratamento verifica-se um aumento da área das folhas- β intramoleculares e uma diminuição das intermoleculares. Ainda assim, para a condição (iv), a área total deste último tipo de folhas- β é superior à área total das intramoleculares, o que significa que estas últimas têm menor influência e portanto prova que há desnaturação causada pelo tratamento térmico. Parris *et al.*, 1991 verificaram algo semelhante durante o aquecimento a 85 °C quer para soro ácido como para o soro doce. Isto também é coincidente com o que já foi concluído para o soro comercial. Na condição (v) observa-se algo ligeiramente diferente que se deve ao facto do acerto de pH ser só feito em último lugar. Estes resultados tinham também sido observados com o soro comercial. Na condição (v) o pH da amostra antes do aquecimento é inferior a 7, e portanto é esperado uma maior resistência à desnaturação, quando comparado com (iv). Com efeito, valores de pH mais baixos conferem maior resistência à desnaturação térmica (Allain *et al.*, 1999) (Fang e Dalgleish, 1997) (Fang e Dalgleish, 1998). Prevê-se então que o aquecimento não provoque tanta desnaturação, havendo muito menos quebra das ligações intramoleculares o que é efectivamente observável na Figura 3.16. Em (v) a área total das folhas- β intramoleculares é ligeiramente superior à área total das folhas- β intermoleculares.

Desta forma as conclusões que se podem retirar são idênticas às que tinham sido apresentadas para o soro comercial. O acerto de pH a 7 seguido de tratamento térmico conduz à desnaturação das proteínas, como se pretendia. No caso do acerto ser feito posteriormente ao aquecimento, a desnaturação sofre uma atenuação. Contudo, esta última condição é a única que permite que o pH do meio seja 7 aquando da adição da TG, sendo que é este pH que é óptimo para acção da enzima.

Assim sendo, apesar da condição (iv) satisfazer melhor a necessidade da desnaturação, a condição (v) é mais favorável à pré-condição do pH do meio ser 7 para acção da enzima.

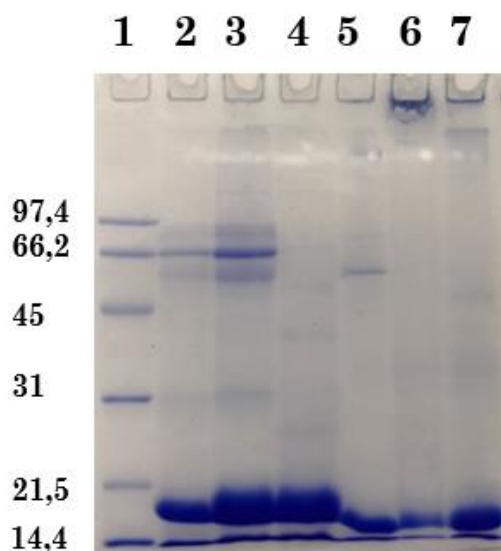


Figura 3.17. Gel de poliácridamida a 12% com amostras de soro de queijo simples e preparado nas duas melhores condições de pré-tratamento. **Os poços 2, 3 e 4 têm adição de β -Me e os poços 5, 6 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2 e 5: soro de queijo simples; poços 3 e 6: com acerto de pH seguido de aquecimento; poço 4 e 7: com aquecimento seguido de acerto de pH.

O soro de queijo simples, isto é, que não foi sujeito a nenhum tratamento e não houve adição de β -Me (Figura 3.17., poço 5), verifica-se a existência de duas bandas no fundo do gel que correspondentes aos monómeros da α -La (14,18 kDa) e da β -Lg (18,4 kDa) (Monahn *et al.*, 1995) (Jovanovic *et al.*, 2007). Estas bandas são claramente distinguíveis uma da outra, contrariamente ao que sucedia para a amostra correspondente de soro comercial em que se observava uma mancha. É possível observar uma banda a aproximadamente 55 kDa que poderá equivaler a tetrâmeros de α -La (56,72 kDa) ou a trímeros de β -Lg (55,2 kDa). Oliveira *et al.*, 2008 que também obteve um padrão idêntico para um soro de queijo bruto, faz correspondência entre esta banda e uma imunoglobulina. Embora muito ténue, também é possível distinguir uma banda no topo do gel e uma mancha mesmo no poço. Tal facto pode ser explicado com a existência de proteínas que apresentam pesos moleculares mais elevados, como por exemplo imunoglobulinas de maior tamanho (aproximadamente 144 kDa) (Monahn *et al.*, 1995). Também podem ser agregados proteicos, dímeros da lactoperoxidase ou da lactoferrina (aproximadamente 155 kDa e 160 kDa, respectivamente), ou então agregados entre as várias proteínas do soro. O facto de ficarem retidas no poço pode significar que o peso molecular era tão elevado que não conseguiram entrar no gel. É ainda de notar a inexistência de arrastamento o que indica que neste soro não há nem muita quantidade nem grande variedade de tamanhos de agregados médios. De frisar que não há dímeros de β -Lg e de α -La (36,8 kDa e 28 kDa, respectivamente), nem dímeros formados pelas duas proteínas

(Moro *et al.*, 2011) (Monahn *et al.*, 1995). Relativamente à amostra na mesma condição, mas à qual foi adicionado o agente redutor (Figura 3.17., poço 2), observa-se que as duas bandas no fundo do gel, correspondente aos monómeros da α -La e da β -Lg, continuam presentes. Pode-se até notar um ligeiro aumento da banda a 18,4 kDa. As bandas do topo do gel desaparecem por completo. Estas duas últimas constatações indicam que o agente redutor quebrou os agregados proteicos, e que estes eram mantidos por ligações dissulfureto (Monahn *et al.*, 1995). Também é visível o aparecimento de uma banda a cerca de 66,2 kDa que pode corresponder à albumina do soro (BSA) que surge como resultado da clivagem dos agregados (Monahn *et al.*, 1995). Neste caso há um pouco mais de arrastamento que podem ser alguns agregados de tamanho médio que resultaram da clivagem dos agregados maiores mantidos por ligações dissulfídicas.

Na condição com acerto de pH a 7 seguido de aquecimento, no poço 6 (Figura 3.17.) estão presentes as bandas do fundo do gel equivalentes aos monómeros das duas proteínas maioritárias. No entanto, em comparação com a condição anterior, em que não há aquecimento, constata-se que as bandas mencionadas sofrem uma notória quebra de intensidade uma vez que o aquecimento provoca a perda de estrutura nativa, e assim sendo ambas as proteínas já não estão na forma monomérica nativa (Moro *et al.*, 2011) (Schocker *et al.*, 1999) (Schocker *et al.*, 2000). Está também uma mancha muito intensa no poço que equivale aos novos agregados proteicos de alto peso molecular (tão elevado que nem conseguiram entrar no gel), formados depois da desnaturação térmica das proteínas e agregados pré-existent (Schocker *et al.*, 2000). Já no poço 3 (Figura 3.17.), no qual foi carregada a amostra nesta condição mas com a presença de agente redutor, regista-se o desaparecimento da retenção de amostra no poço causada pela quebra de ligações dissulfídicas entre os novos agregados da desnaturação, e os consequentes aumento das bandas dos monómeros e o aparecimento de bandas correspondentes a alguns agregados de tamanho médio (região à volta dos 55 kDa) e à proteína BSA.

Quando o acerto de pH só é efectuado depois do aquecimento (poço 7, Figura 3.17.) observam-se as bandas no fundo do gel que equivalem aos monómeros da α -La e da β -Lg, e uma banda no topo do gel que revela a presença de agregados (Dissanayake *et al.*, 2013). Porém, a intensidade das duas primeiras mencionadas é maior e a banda do topo é muito menos intensa do que as bandas respectivas do poço 6 (com acerto de pH *a priori*), o que nos leva a deduzir que há menos desnaturação térmica e por isso menos agregação. Isto é confirmado quando se analisa o poço 4 da mesma figura, no qual está presente o agente redutor. Aqui não aparecem as bandas médias visíveis no poço 3 o que reforça a ideia de que o acerto de pH posterior à aplicação do tratamento térmico torna a desnaturação causada por

este menos eficiente. Também, mais uma vez, se observa um ligeiro aumento da intensidade das bandas do fundo do gel face ao poço onde não havia β -Me, como resultado da quebra das ligações dissulfídicas existentes nos poucos agregados formados.

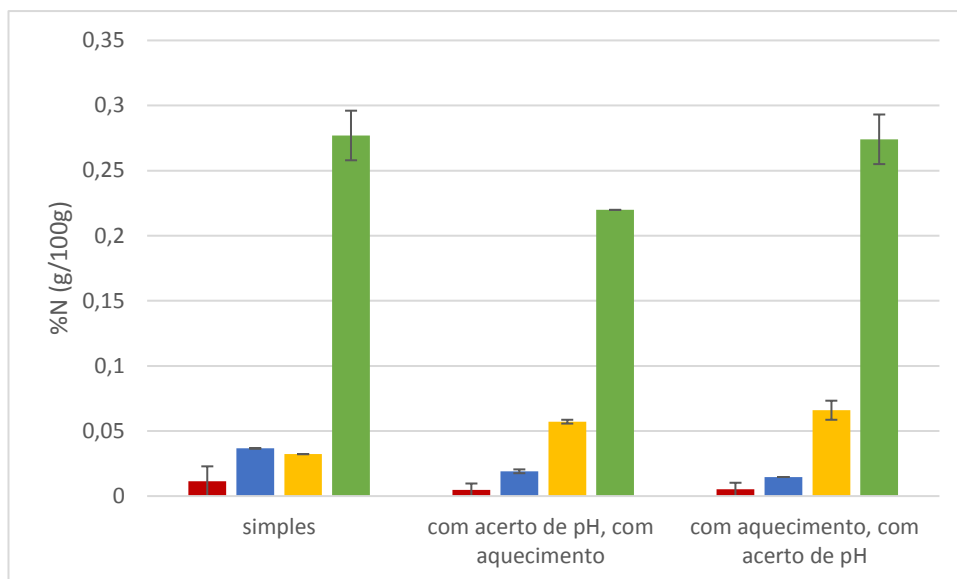


Figura 3.18. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o soro de queijo simples e preparado nas duas melhores condições de pré-tratamento, (iv) e (v). A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal.

Nas duas condições em que há aquecimento verifica-se uma diminuição da fracção de WTC uma vez que ocorre desnaturação das proteínas do soro e portanto há uma redução do teor de proteínas pequenas e péptidos longos. Por outro lado há um aumento do valor da fracção de TCASN já que associado à desnaturação segue-se a agregação dos compostos que daí resultaram, constituindo novos péptidos médios.

Contudo as condições (iv) e (v) voltam a apresentar diferenças notórias entre si. Na primeira, quando o acerto de pH é feito em primeiro lugar o efeito desnaturante do aquecimento é mais acentuado, o que pode ser inferido pela redução mais evidente que se observa na fracção de azoto solúvel em água. Já quando o acerto de pH é posterior (v), não há tanta desnaturação, embora a fracção TCASN seja ligeiramente superior à observada na condição (iv), o que significa que há mais péptidos médios, que podem resultar da formação de agregados na desnaturação.

Todas estas conclusões, retiradas quer destes últimos dados analisados quer dos obtidos nas outras duas técnicas, são idênticas às inferidas para o soro comercial.

O pré-tratamento é obviamente essencial mas mais uma vez terão de continuar a ser testadas estas duas condições. Só com a adição da TG será possível concluir qual é de facto a

melhor condição de pré-tratamento a ser aplicada às amostras de soro, para uma melhor actuação da enzima.

3.2.3. Optimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento

O estudo da quantidade ideal de TG a ser adicionada (isto é, a quantidade mínima que permite os melhores resultados) também foi efectuado para o soro de queijo. Como já foi explicado na secção anterior (3.2.2.) as ligeiras diferenças de composição entre os dois tipos de soro em estudo podem resultar em diferentes comportamentos por parte de cada um. Assim sendo quantidade de TG necessária e suficiente para que se verifique reticulação pode não ser exactamente a mesma que foi encontrada para o soro comercial. Para além disso também é necessário avaliar qual a melhor condição de pré-tratamento para uma eficaz acção da enzima.

Por conseguinte, este estudo é em tudo semelhante ao já apresentado na secção 3.1.2., mas agora com soro de queijo. Prepararam-se amostras deste soro nas duas melhores condições de pré-tratamento – (iv) e (v)- ambas com aquecimento e acerto de pH, mas com ordens inversas. E testaram-se as cinco concentrações seleccionadas no anterior estudo equivalente, a saber : 50 U g⁻¹, 100 U g⁻¹, 200 U g⁻¹, 400 U g⁻¹ e 600 U g⁻¹.

Estas amostras foram analisadas por FTIR e por electroforese de SDS-PAGE. Os resultados são apresentados nas Figuras 3.19. e 3.20. (correspondentes aos dados obtidos por análise dos espectros de FTIR na região amida I, que não são apresentados), e 3.21. e 3.22, respectivamente. O método de Kuchroo e Fox foi apenas utilizado para verificar o efeito da adição da enzima TG; os resultados obtidos estão expressos no gráfico da Figura 3.23.

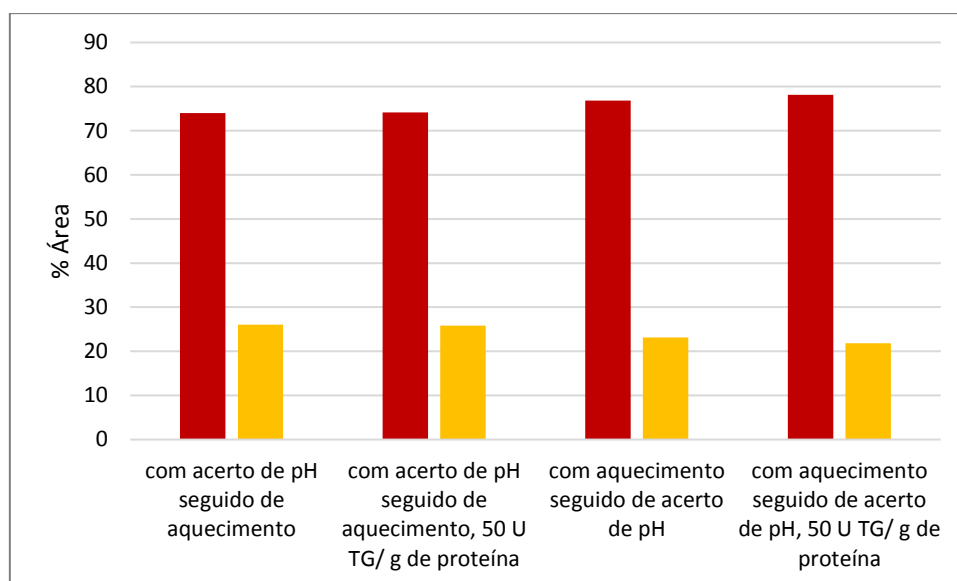


Figura 3.19. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} , nas 2 condições de pré-tratamento seleccionadas, sem e com adição da enzima TG. As barras a vermelho correspondem às folhas- β e as hélices- α são representadas a amarelo.

Na Figura 3.19. observa-se que a adição de TG se traduz no ligeiro aumento da percentagem de área analítica das folhas- β (Eissa *et al.*, 2005) (Eissa *et al.*, 2006), e que este é ligeiramente mais notório para a condição com aquecimento seguido de acerto de pH a 7. Estas constatações são idênticas às obtidas com o soro comercial. Contudo, o aumento mencionado para a condição (v) não é tão evidente como o equivalente que foi observado para o soro comercial (Figura 3.11.) confirmando o inicialmente previsto; os soros têm de facto comportamentos distintos sendo a acção da TG mais evidente no soro comercial.

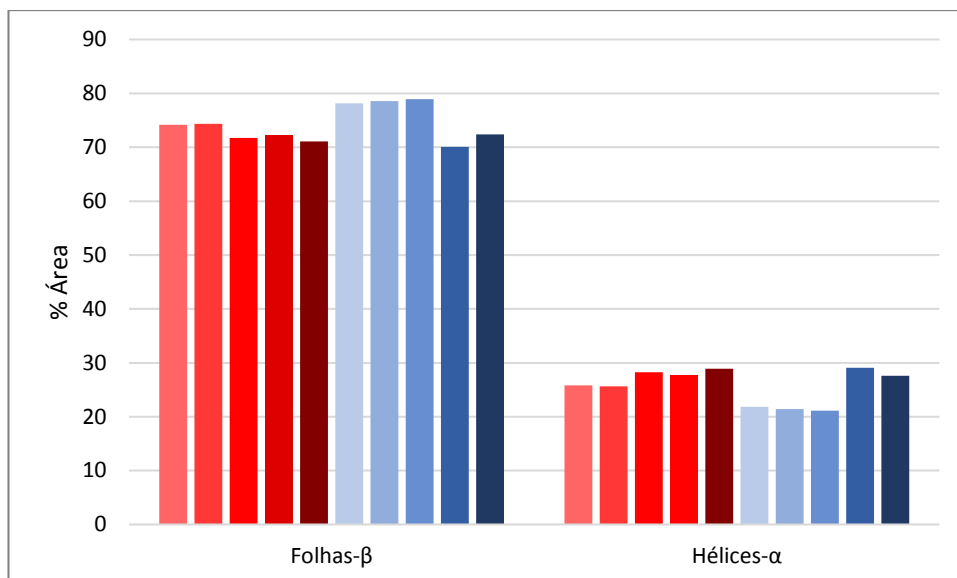


Figura 3.20. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm^{-1} . As barras a vermelho correspondem à condição (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento e as azuis à (v) com aquecimento seguido de acerto de pH. A gradação das cores do mais claro para o mais escuro é indicativo do respectivo aumento da quantidade de TG adicionada (50-600 U TG g^{-1}).

Para ambas as condições de pré-tratamento, verifica-se que os melhores resultados são obtidos quando se usam concentrações mais baixas de TG, uma vez que apresentam maiores percentagens de área analítica para as folhas- β . Para a condição (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento (a vermelho) verificam-se melhores resultados apenas quando se usa 50 ou 100 U TG por grama de proteína, enquanto que para a condição (v) a concentração 200 U g^{-1} também é favorável. Também para as duas condições se observa que quantidades superiores apresentam sempre piores resultados. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com o soro comercial.

Comparando directamente as amostras pré-preparadas nas duas condições diferentes verifica-se que quando se faz o acerto de pH em último lugar há sempre resultados ainda mais favoráveis. Nesta condição, apesar da adição de 200 U de TG por grama de proteína reflectir resultados ligeiramente mais favoráveis, a percentagem de área analítica das folhas- β é semelhante à obtida para a concentração imediatamente anterior, 100 U g^{-1} . Assim sendo, e por uma questão de economia de recursos, que é importante do ponto de vista industrial, e atendendo também aos resultados observados com o soro comercial, optou-se por escolher esta última concentração de TG para ser adicionada ao soro de queijo previamente aquecido e com acerto de pH a 7 (exactamente por esta ordem indicada) nos estudos seguintes com o soro de queijo.

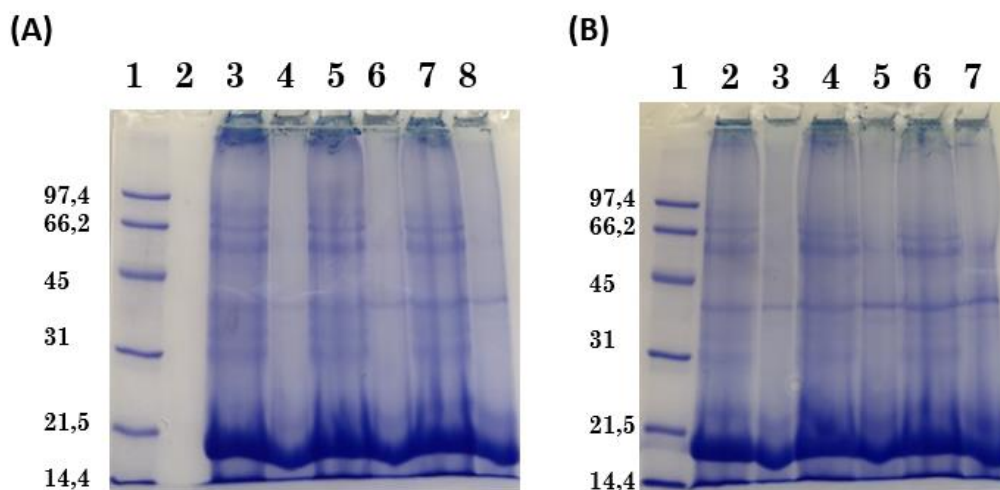


Figura 3.21. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento, e com várias quantidades de TG adicionadas. **(A) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína. **(B) Os poços 2, 4 e 6 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poços 2 e 3: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína; poços 4 e 5: adição de 400 U TG g⁻¹ de proteína; poços 6 e 7: adição de 600 U TG g⁻¹ de proteína.

Na análise por electroforese de SDS-PAGE, para ver o efeito da adição de TG compara-se o poço 4 da Figura 3.21. A com o poço 6 da Figura 3.17., secção 3.2.2., que dizem respeito a amostras com pré-tratamentos idênticos (com acerto de pH seguido de aquecimento), mas sem e com adição de TG, respectivamente. Verifica-se que no que contém TG há alguma retenção de polímeros nos poços equivalente a polímeros de alto peso molecular que não conseguem entrar no gel e que resultaram da reticulação promovida pela enzima (Eissa *et al.*, 2004) (Eissa *et al.*, 2005) (Villas-Boas *et al.*, 2010) (Villas-Boas *et al.*, 2012) (Damodaran e Agyare, 2013) (Zhong *et al.*, 2013). Ainda assim as suas dimensões permitem alguma solubilidade e a sua carga nos poços, ao contrário do que tinha ocorrido com o soro comercial. Isto pode significar que a TG não provocou tanta reticulação das proteínas do soro do queijo como tinha feito com as do outro tipo de soro usado. Isto está de acordo com o concluído pelos dados do FTIR e confirma as ligeiras diferenças previstas entre os dois tipos de soro. Porém, no poço onde não havia TG também era visível esta retenção. A explicação é que os polímeros de alto peso molecular têm origens diferentes: os do poço que contém a amostra sem TG resultam da agregação que ocorre como consequência da desnaturação térmica, os do poço onde há TG resultam adicionalmente do fenómeno de reticulação promovida por esta enzima (Eissa *et al.*, 2004) (Eissa *et al.*, 2005). Isto é comprovado quando se adiciona o β -Me. Recordando, este agente redutor apenas quebra ligações dissulfídicas. As ligações ϵ -(γ -

glutamil)lisina que mantém os polímeros da reticulação permanecem intactas, e portanto estes polímeros não são clivados (Eissa *et al.*, 2004) (Eissa *et al.*, 2005). De facto analisando nos géis representados os poços com β -Me, verifica-se que face aos que não têm este composto, há um aumento da intensidade das bandas do fundo do gel equivalente aos monómeros da α -La e da β -Lg. Também há um aumento do arrastamento, indicativo de polímeros de mais baixo e variados pesos moleculares, destacando-se bandas na região entre os 55 kDa e 70 kDa e, um pouco mais ténues, bandas entre os 25 e os 45 kDa. Isto significa que na retenção no poço estavam presentes agregados proteicos formados por ligações dissulfídicas, resultantes do aquecimento. Mas apenas parte dessa retenção equivale a estes agregados. Isto porque nos mesmos poços com β -Me continua a ser visível alguma retenção e surge uma banda no topo do gel, o que indica que também há agregados de alto peso molecular que não são formados por ligações dissulfídicas e que portanto podem indicar polímeros resultantes da reticulação pela TG. O facto de aparecerem mais evidentes nestes poços onde se adicionou o agente redutor à amostra, deve-se aos outros agregados resultantes do aquecimento já terem sido clivados deixando de haver uma concentração total de agregados tão elevada, tornando assim aqueles que se mantiveram mais facilmente solúveis e por isso mais visíveis.

Quanto ao objectivo concreto desta secção, de tentar perceber qual a melhor quantidade de TG para adicionar, é difícil a partir destes géis tirar alguma conclusão; efetivamente não são observadas diferenças entre as várias concentrações. Ainda assim parece haver um pouco mais de reticulação com 50 U TG g⁻¹, dado que se assemelha aos dados obtidos por FTIR que apontavam para doses de 50-100 U TG g⁻¹. Os resultados suportam e confirmam a avaliação anterior feita para o soro comercial de que a técnica de electroforese SDS-PAGE para análise da reticulação pela TG pode ser limitada e pouco sensível, tal como indicado por Jong e Koppelman (2002).

Na Figura 3.22., referente ao mesmo estudo mas desta vez com as amostras preparadas com a condição (v), observa-se algo aproximado. Comparativamente ao estudo realizado nas amostras preparadas na outra condição (Figura 3.21.), verifica-se apenas que nos poços com β -Me há menos arrastamento e desaparecem as bandas destacadas de tamanho médio. As três concentrações de TG mais baixas parecem ter mais efeito que as superiores uma vez que as bandas do topo do gel são mais intensas, sendo um pouco mais evidente na concentração 200 U TG g⁻¹, tal como tinha sido observado por FTIR.

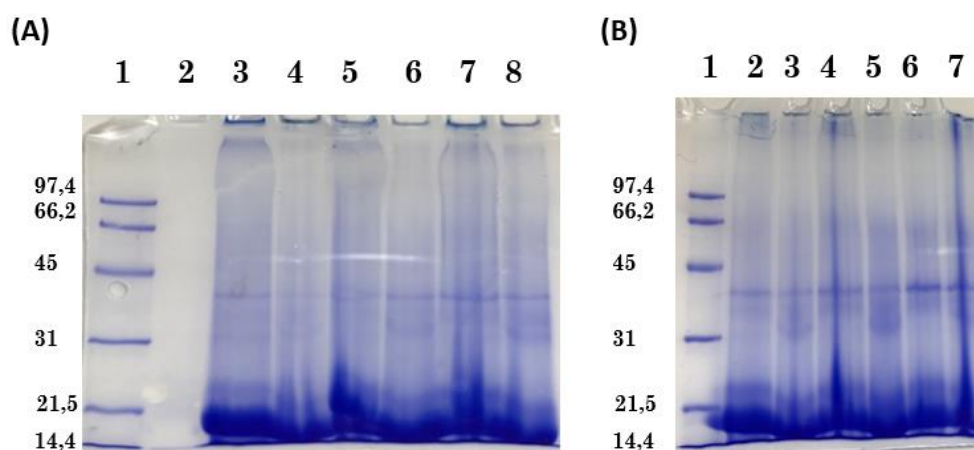


Figura 3.22. Gel de poliacrilamida a 12% das amostras pré-preparadas na condição (v) com aquecimento seguido de acerto de pH, e com várias quantidades de TG adicionadas. **(A) Os poços 3, 5 e 7 têm adição de β -Me e os poços 4, 6 e 8 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: vazio; poços 3 e 4: adição de 50 U TG g⁻¹ de proteína; poços 5 e 6: adição de 100 U TG g⁻¹ de proteína; poços 7 e 8: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína. **(B) Os poços 2, 4 e 6 têm adição de β -Me e os poços 3, 5 e 7 não têm adição deste composto.** Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poços 2 e 3: adição de 200 U TG g⁻¹ de proteína; poços 4 e 5: adição de 400 U TG g⁻¹ de proteína; poços 6 e 7: adição de 600 U TG g⁻¹ de proteína.

Quanto à metodologia de Kuchroo e Fox, esta apenas foi utilizada para verificar o efeito da adição da enzima TG, já na condição de pré-tratamento e com a quantidade de TG optimizadas (que se conclui pelas outras duas técnicas anteriores), e para confirmar os dados obtidos por FTIR e electroforese por SDS-PAGE. Esta metodologia não foi realizada a todas as doses de TG e pré-condições uma vez que para tal seria necessário uma quantidade de amostra de soro de queijo e de TG muito elevada (desvantagem do método). Os resultados das diferentes fracções proteicas podem ser observados na Figura 3.23.

Verifica-se que quando se adiciona a enzima TG há diminuição da fracção PTASN. Isto significa que há uma menor quantidade de compostos de tamanho mais reduzido, nomeadamente péptidos curtos, resíduos de aminoácidos e amoníaco, uma vez que a TG induz a agregação destes compostos. Por esta razão, e tal como se observou para o soro comercial, esperar-se-ia também ver um aumento do teor de TCASN, o que não acontece. Por outro lado, verifica-se a diminuição da fracção WTC, indicando que com a adição de TG a quantidade de proteínas de pequena dimensão é mais reduzida. Significa, portanto, que deve ter ocorrido a reticulação de proteínas de pequena dimensão e se tenham formado proteínas de dimensão elevada, as quais não são passíveis de serem determinadas por esta metodologia.

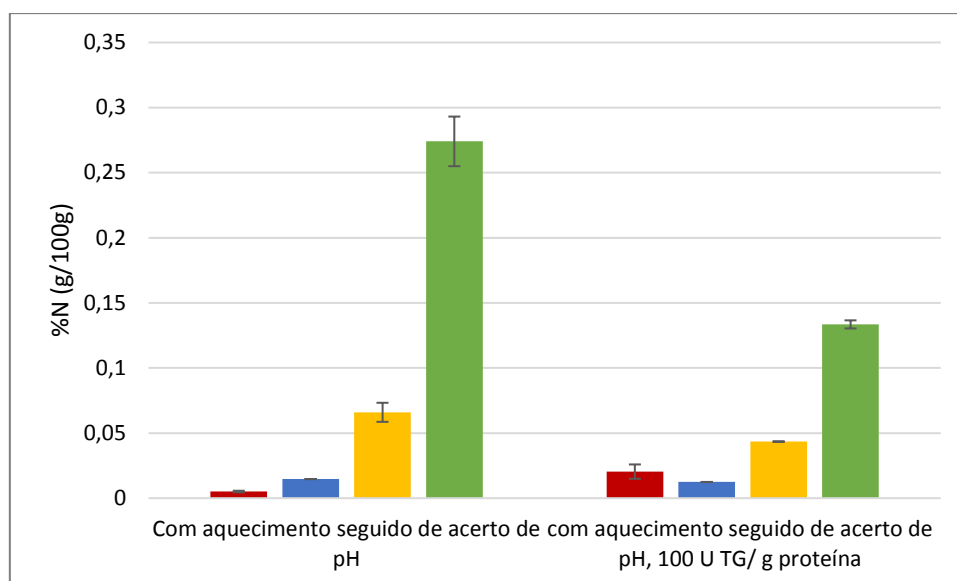


Figura 3.23. Percentagem de azoto (%N) obtida para as diversas fracções proteicas analisadas, com o amostras preparadas na melhor condição de pré-tratamento, (v), e com a adição da melhor quantidade de TG, 100 U TG g⁻¹. A verde está representado o azoto solúvel em água (WTC), a amarelo o azoto não proteico (TCASN), a azul o azoto aminoacídico (PTASN) e a vermelho o azoto amoniacal.

A ocorrência de reticulação é confirmada pelo facto da fracção de azoto amoniacal (Figura 3.23., a vermelho) sofrer um expressivo aumento, uma vez que a reacção de reticulação catalisada pela TG conduz à libertação de uma molécula de NH₃ (Jong e Koppelman, 2002), tal como tinha sido observado para o soro comercial.

3.2.4. Estudo cinético da reticulação pela transglutaminase na melhor condição de pré-tratamento e com a melhor quantidade de enzima adicionada

Para além da quantidade de TG adicionada (já optimizada) outros dois aspectos foram já referidos como cruciais para uma eficaz acção da TG: a temperatura e o tempo de reacção.

O estudo da temperatura não foi efectuado uma vez que a maioria da literatura é unânime na utilização da definição de 50 °C, como sendo a temperatura óptima de acção da TG. Para além disso como refere Ikeda et al. (2013), a própria brochura que acompanha a enzima, que contém indicações do produtor, menciona esta temperatura como sendo a óptima de funcionamento.

Quanto ao tempo de reacção, nos primeiros estudos usámos sempre um tempo superior a 12 horas uma vez que ao fim deste período a enzima deixa de estar activa (Eissa et al., 2006), garantindo assim que ocorreu toda a reacção possível de ter ocorrido. Contudo, muitos outros artigos fazem estudos semelhantes com tempos de reacção com TG muito inferiores; em

alguns, o período temporal é mesmo muito diminuto. Interessa-nos verificar qual é de facto o tempo mínimo necessário com o qual ocorre o máximo de reacção de reticulação das proteínas do soro de queijo pela TG.

Assim, fez-se um estudo cinético com o soro de queijo preparado com o pré-tratamento óptimo, isto é, com aquecimento a 80 °C durante uma hora, seguido de acerto de pH a 7, e ao qual foi adicionado a quantidade de TG também optimizada – 100 U g⁻¹ de proteína. Foram retiradas amostras de duas em duas horas ao longo de um período de 10 horas (às 0, 2, 4, 6, 8 e 10h). Este tempo máximo foi escolhido, em detrimento das 14 horas e 30 minutos já utilizadas, uma vez que Aguiar (2017), num estudo paralelo com o soro comercial também estudado neste trabalho, indicou que a reticulação atingia o seu máximo às 10h.

Neste estudo, as amostras correspondentes a cada tempo foram analisadas por FTIR e por electroforese SDS-PAGE, e os respectivos resultados são apresentados nas Figuras 3.24. e 3.25.

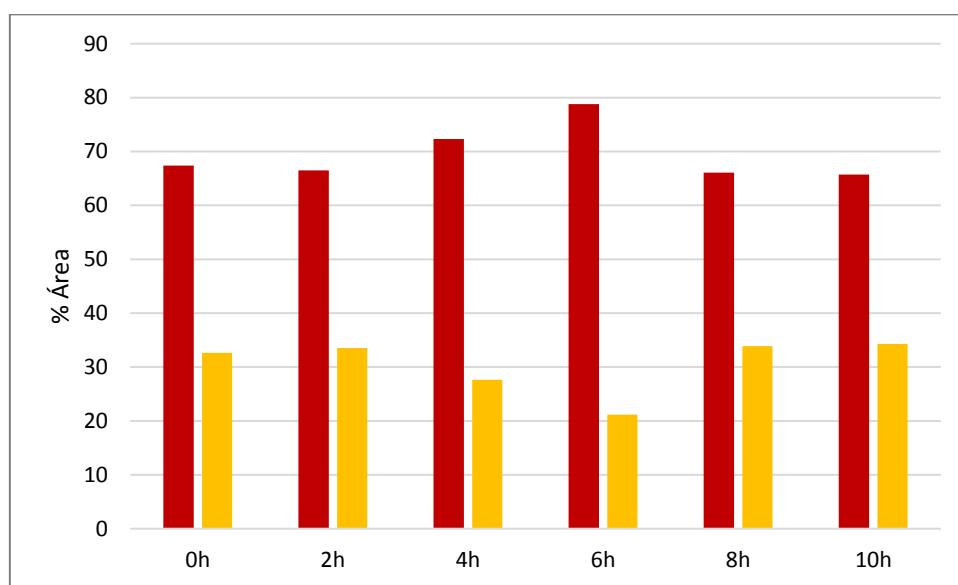


Figura 3.24. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR, na janela 1700-1600 cm⁻¹, nos vários tempos de reacção com TG. As barras a vermelho correspondem às folhas-β e as hélices-α são representadas a amarelo.

Sabe-se que a reticulação pela TG se traduz numa maior influência das folhas-β. Analisando a Figura 3.24. verifica-se que à sexta hora é quando se obtém o maior valor de percentagem de área analítica para a estrutura secundária referida o que aponta para que seja este o tempo ideal para a reacção da TG no soro de queijo estudado.

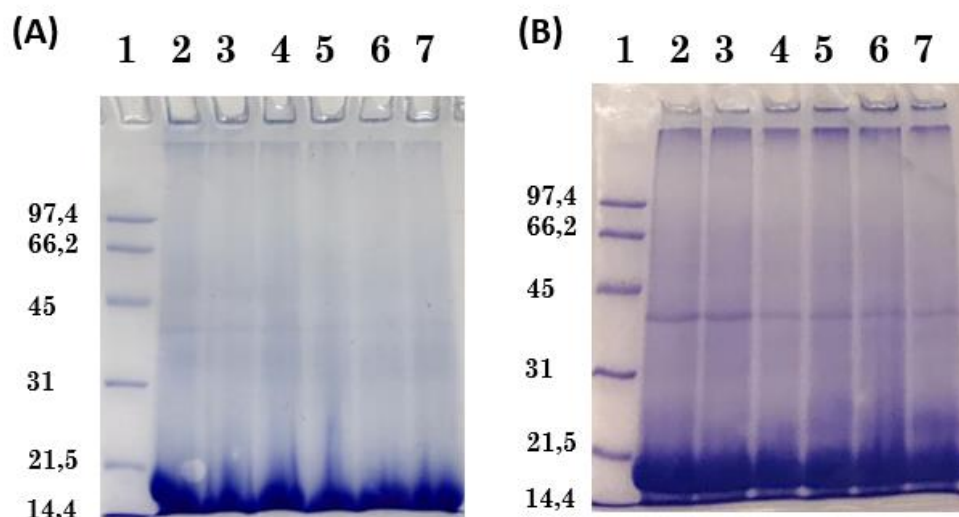


Figura 3.25. Gel de poliacrilamida a 12% do estudo da cinética do soro de queijo com a 100 TG g⁻¹ de proteína. Amostras **sem (A) e com (B) adição de β-Me**. Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: 0h; poço 3: 2h; poço 4: 4h; poço 5: 6h; poço 6: 8h; poço 7: 10h.

Os resultados do FTIR são corroborados pelo gel de electroforese SDS-PAGE. Pela análise da Figura 3.25. B é possível verificar que a banda do topo do gel equivalente a polímeros de alto peso molecular resultantes da reticulação destaca-se um pouco mais no poço 5 correspondente à amostra onde a reacção com a TG ocorreu durante 6 horas. Na parte B da figura mencionada, para além de ser muito notória a diferença da banda referida face às outras bandas dos outros poços do que em A, garante também que toda essa banda do topo usada como referência corresponde unicamente a agregados resultantes da reticulação enzimática, já que está presente o agente redutor β-Me.

Podemos deste modo, por ambas as técnicas, concluir que com 6 horas de reacção se consegue obter o máximo de reticulação pela TG, para o caso do soro de queijo.

3.2.5. Avaliação da estabilidade do soro de queijo reticulado pela transglutaminase

A deterioração dos alimentos pode ser definida de várias formas, sendo que, geralmente, um alimento é considerado corrupto quando já não é aceitável para o consumidor (Cunha, 2015). O tempo que leva para um produto alimentar atingir a deterioração é denominado por período de vida útil do produto (Steele, 2004). Existem três factores que influenciam e determinam este período temporal: a segurança alimentar (do ponto de vista

microbiológico e químico), a manutenção das propriedades físicas, químicas, nutricionais, de textura e sensoriais, e a aceitação por parte do consumidor. Destaca-se o primeiro, relacionado com a contaminação do alimento por microrganismos patogénicos, uma vez que pode ter implicações na saúde do consumidor, podendo mesmo conduzir à morte. As alterações microbiológicas podem também contribuir para a degradação das características do alimento. Esta pode igualmente ser causada por mudanças físicas ou químicas, como por exemplo a temperatura ou reacções entre os componentes do alimento, respectivamente, que podem levar, por exemplo à sua degradação oxidativa. Casos menos graves de deterioração pode ser a modificação das propriedades organolépticas do alimento (cor, sabor, textura ou aroma) deixando de ser aceitável para o consumidor (Cunha, 2015).

Assim é essencial determinar este período de vida útil para um determinado produto, de modo a garantir que o consumidor o adquira sempre nas melhores condições. Por isso procedeu-se à avaliação da estabilidade do produto final produzido – o soro de queijo reticulado com TG nas condições optimizadas (pré-tratamento de aquecimento a 80 °C durante uma hora, seguido de ajuste de pH a 7, reacção de 100 U TG g⁻¹ de proteína durante 6 horas). Foi armazenado no frigorífico a uma temperatura de 4 °C. Quanto ao período temporal a analisar a escolha teve por base o tempo de vida útil indicado por Cunha (2015) para um soro de iogurte em bruto. Nesse estudo verificou-se que as amostras de soro apresentavam estabilidade a nível químico por 21 dias. Contudo verificou-se o desenvolvimento de bolores e leveduras, sendo que os valores obtidos foram superiores ao estipulado pela legislação (para o iogurte) a partir dos 13 dias (Cunha, 2015). Decidiu-se então fazer a análise do soro de queijo reticulado ao longo de 15 dias.

A avaliação da estabilidade incidiu nas alterações físico-químicas, nomeadamente pH e acidez, que podem dar informação sobre a degradação do soro (Cunha, 2015). Mas pretendia-se sobretudo saber, também, se as proteínas do soro permaneciam reticuladas ao longo do tempo. Se as proteínas deixarem de estar reticuladas, podem voltar a desencadear reacções alérgicas e portanto o produto deixa de poder ser utilizado pelos seus consumidores alvo (pessoas com alergia às proteínas do soro do leite). Para esta análise específica recorreu-se às técnicas que foram sendo usadas ao longo de todo este trabalho (FTIR, electroforese SDS-PAGE e a metodologia Kuchroo e Fox).

É de referir que não foi encontrada literatura referente a esta avaliação da estabilidade das proteínas de soro reticuladas com TG, e que possa servir de comparação. Todos os estudos em que a reticulação com TG é estudada apontam unicamente para a avaliação da reticulação imediatamente após contacto com a TG. Como referência utilizaram-se dados de soro de queijo e também de iogurte simples (Cunha, 2015). Contudo, apesar do soro em bruto poder

ser utilizado para vários fins, os estudos de estabilidade existentes na literatura são geralmente efectuados no soro processado (concentrado ou em pó) ou no produto onde o soro foi incorporado (Cunha, 2015). Também se utilizou dados de outros produtos lácteos como o próprio queijo e iogurte, e que estão na origem da produção de soro (Cattaneo *et al.*, 2004) (Schmidt e Bouma, 1992) (Hough *et al.*, 1999).

Em relação à evolução do pH e acidez, os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 3.26. e 3.27., respectivamente.

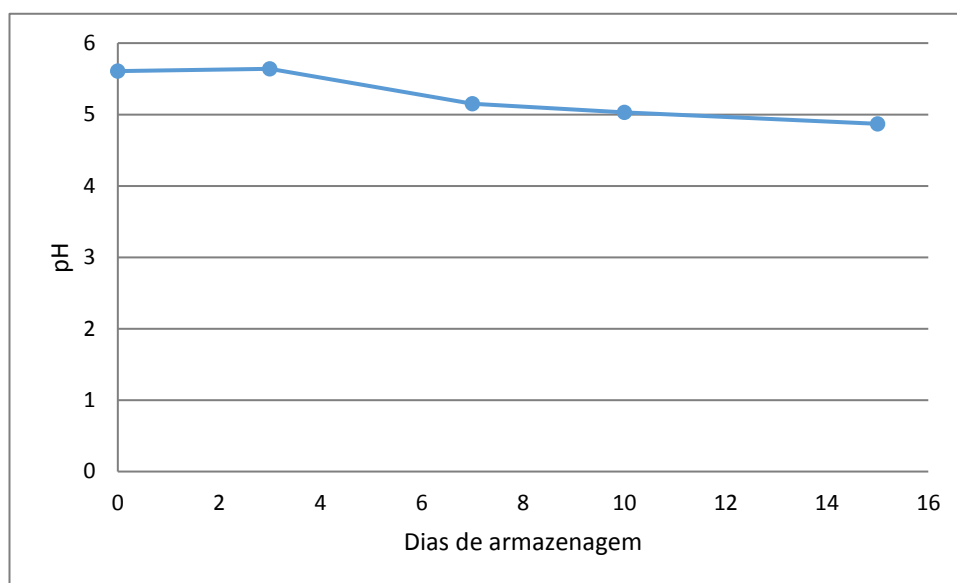


Figura 3.26. Evolução do pH do soro de queijo reticulado pela TG ao longo do período de armazenagem.

Observa-se uma ligeira e gradual descida do pH ao longo do período de armazenagem. Esta variação é corroborada pelo progressivo aumento da acidez do produto (Figura 3.27).

Cunha, 2015 não verificou variações significativas nem no pH e consequentemente também nos valores da acidez, para soro de iogurte. Ainda assim indica que entre os dias 0 e 13 se verifica uma ligeira redução do pH. Noutro estudo com queijo *cottage* (um tipo de queijo que é produzido por acidificação do leite, e que é drenado mas não prensado, e portanto contém algum soro) constatou-se algo idêntico. Em amostras conservadas a 4 °C o pH permanecia relativamente constante ao longo de 16 dias (Schmidt e Bouma, 1992). Por outro lado, outros dois estudos feitos com outros dois tipos diferentes de queijo – *ricotta* (fabricado a partir de soro de leite, e semelhante a requeijão) e queijo fresco – registaram abaixamento do pH e respectivo aumento da acidez (Cattaneo *et al.*, 2005) (Hough *et al.*, 1999).

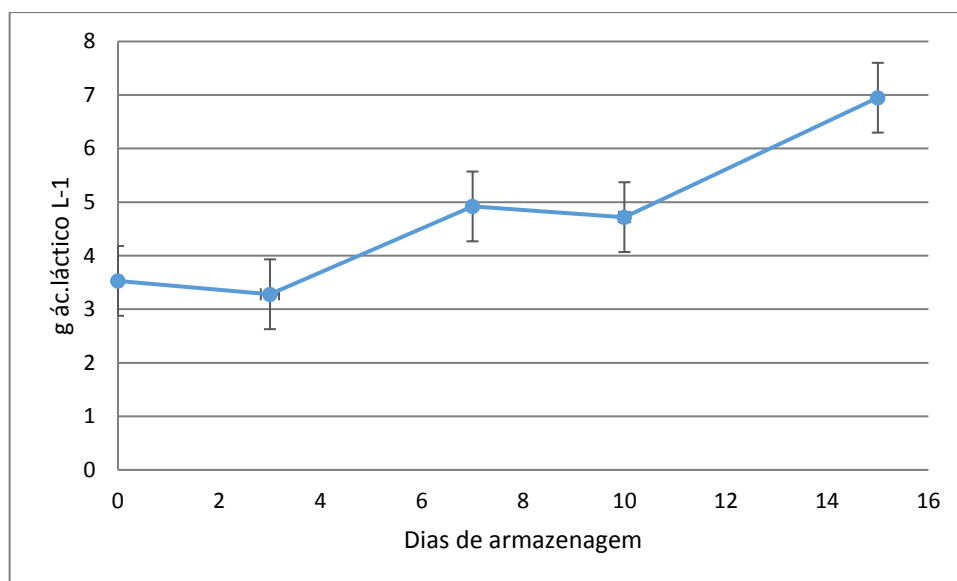


Figura 3.27. Evolução da acidez do soro de queijo reticulado pela TG ao longo do período de armazenagem.

A diminuição de pH/aumento da acidez sugere a presença e actividade (apesar de minimizada a 4 °C) de bactérias produtoras de ácido láctico (LAB), que são microrganismos que produzem este ácido a partir da metabolização da lactose (Schmidt e Bouma, 1992) (Lima *et al.*, 2014) (Cunha, 2015). De fato, enúmeros estudos indicam que o pH e acidez estão correlacionados com a presença destes microrganismos (Cunha, 2015).

Os valores de pH obtidos (ácidos) contribuem também para a inibição do crescimento de alguns microrganismos que podem causar a deterioração do soro, o que é uma vantagem deste produto. Por exemplo, a *Acinetobacter* spp. e o *Bacillus subtilis* são bactérias conhecidas por causar deterioração em produtos lácteos, mas ambos necessitam de pH acima de 4,2 para se multiplicarem. Neste caso, apesar do pH do soro ser superior a 4,2, pelo fato deste soro estar a pH ácido, estes microrganismos poderão ter um desenvolvimento mais lento. Entre os patogénicos que conseguem crescer aos pH ácidos e que podem ser encontrados nos lacticínios encontram-se a *Escherichia coli* O157:H7 e a *Salmonella* spp.. Estas bactérias podem multiplicar-se a pH acima de 4,0 mas possuem uma temperatura mínima de crescimento de 15 e 7 °C respectivamente, pelo que podem ser controladas colocando o alimento a 4 °C. Já a *Listeria monocytogenes*, uma contaminação mais comum na indústria de lacticínios, necessita dum pH mínimo de 4,3 para o seu crescimento, enquanto que os bolores e leveduras conseguem crescer a pH mais baixos (Steele, 2004). As subespécies de *Candida* são agentes de deterioração em lacticínios e, como a maioria dos fungos, têm um pH mínimo de crescimento inferior a 2. O valor de pH mínimo da maioria das leveduras situa-se entre 1 e 5

(Steele, 2004). O crescimento de bolores e leveduras é um problema conhecido nos laticínios e que é atribuído ao facto de conseguirem crescer a baixas temperaturas, de assimilar/fermentar a lactose, de assimilar ácidos orgânicos como os succínico, láctico e cítrico, à sua actividade lipolítica e proteolítica e resistência a concentrações elevadas de sal (Viljoen, 2001).

Estes parâmetros (pH e acidez) dão assim alguma informação sobre o estado microbiológico do produto podendo servir de certa maneira como indicador da qualidade sanitária (Lima *et al.*, 2014). Ainda assim, a realização de análises microbiológicas, com contagem de vários grupos de microrganismos, permite de uma forma mais rigorosa e detalhada inferir da higiene do alimento (Schmidt e Bouma, 1992) (Hough *et al.*, 1999) (Papaioannou *et al.*, 2007) (Pierro *et al.*, 2010). No seguimento deste estudo, a validação da estabilidade deveria ser avaliada com estas análises.

Também é usual fazer-se uma avaliação sensorial na medida em que, como já foi referido, o aspecto geral, o aroma e o sabor têm grande impacto no consumidor determinando em grande medida a aceitabilidade por parte deste (Schmidt e Bouma, 1992) (Hough *et al.*, 1999) (Papaioannou *et al.*, 2007) (Pierro *et al.*, 2010).

Quanto ao objectivo principal de saber se o produto mantém a reticulação ao longo do tempo, os resultados obtidos por FTIR são apresentados na Figura 3.28.

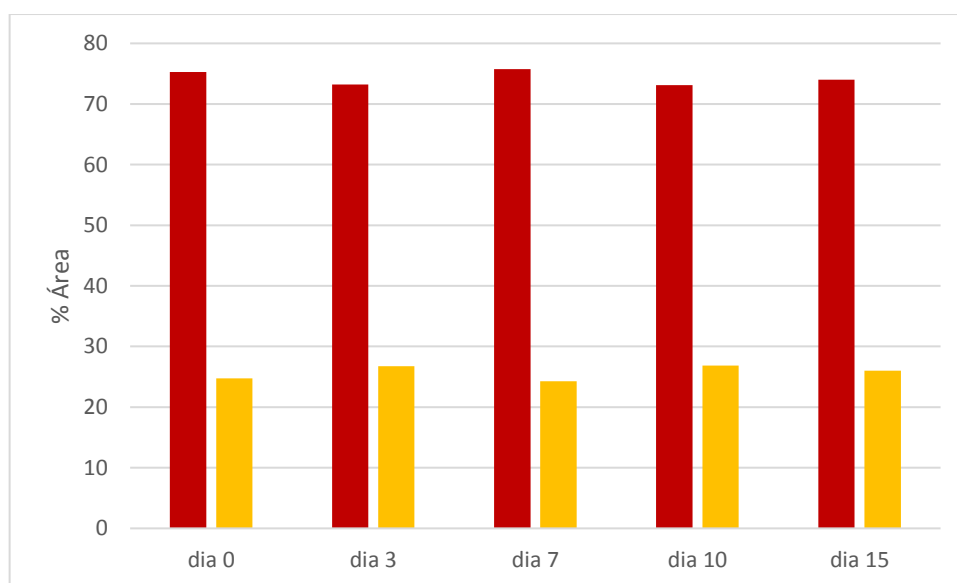


Figura 3.28. Somatório das áreas analíticas correspondentes às bandas obtidas pela desconvolução dos espectros de FTIR (não apresentados), na janela $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, ao longo do tempo de armazenagem. As barras a vermelho correspondem às folhas- β e as hélices- α são representadas a amarelo.

É possível constatar (Figura 3.28.) que a influência das folhas- β , dada pela percentagem de área analítica, é sempre bastante elevada e ao longo dos dias apenas oscila muito ligeiramente e sem tendência. Isto parece indicar que a reticulação se manteve ao longo do período de armazenagem.

Para averiguar a veracidade e dar robustez ao que foi concluído através do FTIR realizou-se uma electroforese SDS-PAGE. Os géis obtidos estão representados na Figura 3.29..

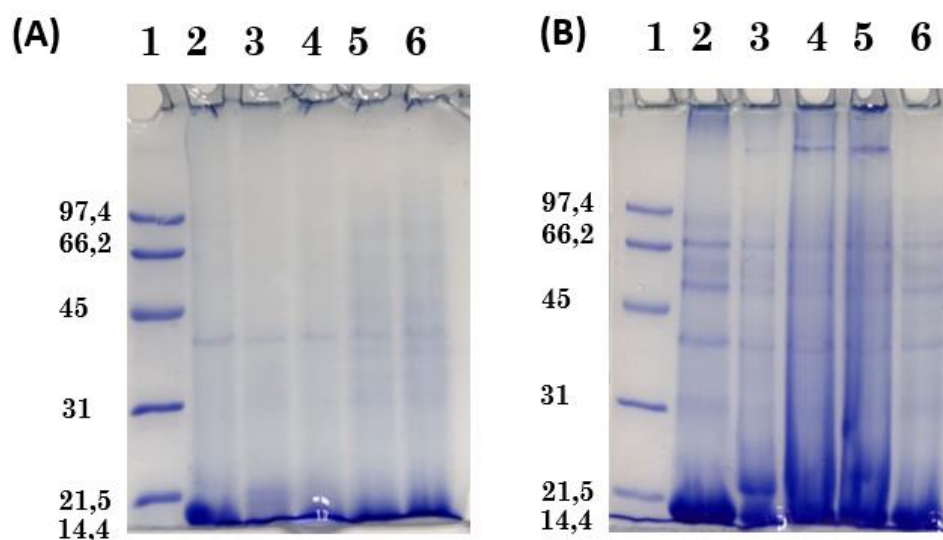


Figura 3.29. Gel de poliacrilamida a 12% do estudo da avaliação da estabilidade do soro de queijo reticulado com transglutaminase, nas condições óptimas. Amostras **sem (A) e com (B) adição de β -Me**. Poço 1: Marcador de PM Low range da BioRad; poço 2: dia 0; poço 3: dia 3; poço 4: dia 7; poço 5: dia 10; Poço 6: dia 15.

No gel A (Figura 3.29.), no qual as amostras carregadas não tiveram adição de β -Me, observa-se uma banda no fundo correspondente ao monómero da α -La (14,18 kDa). Nessa zona nota-se ainda algum arrastamento que pode corresponder a alguma β -Lg. O facto de não aparecer a banda definida do monómero desta proteína pode significar que ela foi praticamente toda reticulada que era o que mais se pretendia uma vez que é a mais alergénica de todas as proteínas do soro. Outra indicação de possível reticulação é a retenção de amostra observada nos poços que corresponde a polímeros de alto peso molecular que não conseguiram entrar no gel. Esta retenção é muito ténue que, como já foi explicado mais detalhadamente nas secções anteriores, se deve a alguma insolubilidade por parte destes polímeros. No gel B (Figura 3.29.) com amostras com adição do agente redutor, confirma-se esta dedução porque se mantém a retenção nos poços e bandas no topo do gel que portanto equivalem a polímeros que são formados por outras ligações que não as dissulfídicas. Contudo também havia alguns deles que eram mantidos por estas últimas ligações uma vez que se

observa maior arrastamento no meio da corrida, bem como bandas definidas nesta região. Estas bandas equivalem a agregados de tamanhos médios variados, especificamente dímeros de β -Lg (36,8 kDa), sobretudo, e também dímeros de α -La (28 kDa) e dímeros formados pelas duas proteínas (aproximadamente 32 kDa); a tetrâmeros de α -La (56,72 kDa) ou a trímeros de β -Lg (55,2 kDa). Também é visível uma banda a cerca de 66,2 kDa que pode corresponder à albumina do soro (BSA) que resulta da clivagem dos agregados. Em alguns poços há ainda mais uma banda na parte superior que podem ser proteínas que apresentam pesos moleculares mais elevados, como por exemplo imunoglobulinas (aproximadamente 144 kDa), ou alguns agregados proteicos, dímeros da lactoperoxidase ou da lactoferrina (aproximadamente 155 kDa e 160 kDa, respectivamente), ou então agregados entre as várias proteínas do soro. Ao mesmo tempo que é acompanhado do aumento da intensidade da banda do fundo do gel, que parece já não ser só equivalente aos monómeros de α -La mas também a alguns monómeros da β -Lg.

Concretamente no que diz respeito à variação ao longo do tempo, pelo gel B parece não haver alterações até ao terceiro dia de armazenagem. Depois ao sétimo e ao décimo dia parece notar-se com mais detalhe a reticulação, sugerindo que a reticulação tem algum aumento. Hosseinpour *et al.*, 2011 registou o aumento da intensidade de uma banda de alto peso molecular ao longo do armazenamento; foi no entanto para o soro simples. Ao décimo quinto dia a retenção e banda no topo do gel deixa de estar presente o que pode indicar alguma perda de reticulação. Contudo, e tal como apontado anteriormente, pode existir alguma falta de sensibilidade desta técnica para a deteção de reticulação pela TG.

Também por isto se aplicou mais uma técnica – a metodologia Kuchroo e Fox. Determinou-se apenas as fracções de azoto solúvel em água pois contém compostos de tamanho maior, podendo dar assim uma boa indicação da presença de polímeros formados por reticulação. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.30..

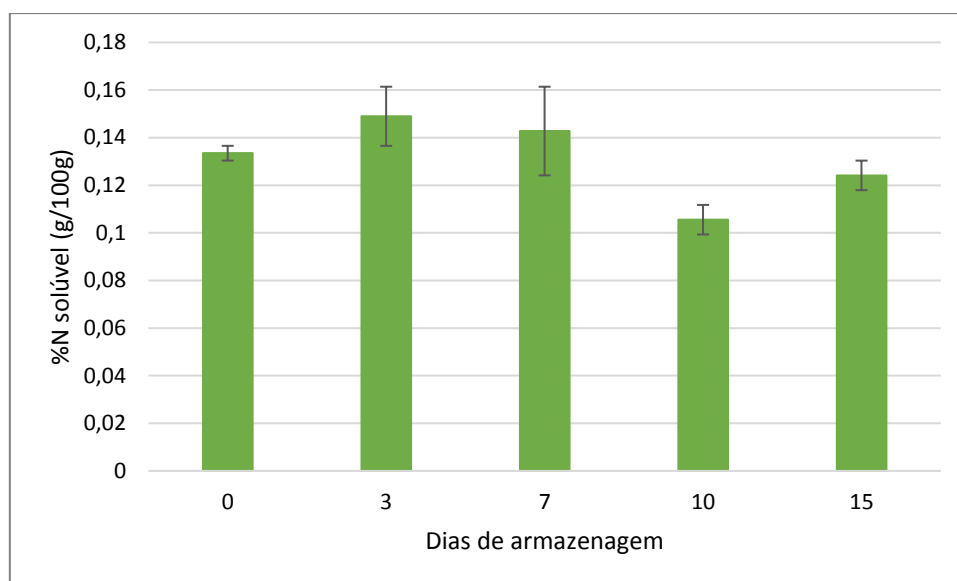


Figura 3.30. Percentagem de azoto (%N) da fracção de azoto solúvel em água (WTC), do soro de queijo reticulado pela TG, ao longo do tempo de armazenagem.

Os valores ao longo dos primeiros 7 dias parecem não sofrer grandes flutuações. Já nos dias 10 e 15 há uma diminuição do valor da fracção indicando uma possível diminuição da presença de agregados proteicos e portanto uma diminuição do conteúdo proteico reticulado. Efectivamente as proteínas podem sofrer alguma degradação ao longo do tempo. Esta degradação, para além de comprometer o desempenho funcional das proteínas pode ainda afectar o flavour por produção de aminoácidos livres, pequenos péptidos e precursores de compostos volatéis, e no caso específico do estudo, pode haver a reversão da reticulação das proteínas do leite. A proteólise nos lacticínios ocorre em suas fases sequenciais: hidrólise primária, que tem como responsável a principal proteinase do leite - a plasmina; e a secundária, que ocorre principalmente por acção das enzimas da flora microbiana nativa. A primeira etapa também conhecida por “extensão da proteólise”, resulta na produção de péptidos longos, eventualmente insolúveis em água, e médios, solúveis em água, e que por isso está directamente com o valor de WTC; a segunda corresponde à degradação subsequente desses péptidos em péptidos de cadeia curta e aminoácidos livres (Steele, 2004) (McSweeney e Fox, 1997). No entanto, para soro de iogurte em bruto não foram registadas alterações ao longo do tempo de armazenagem para este parâmetro (Cunha, 2015). De qualquer das formas, no presente caso o valor desta fracção nos dias 10 e 15 não retoma valores tão elevados como os observados nos primeiros dias analisados (0, 3 e 7), o que indica que de facto pode ter havido alguma perda de reticulação e alguma degradação proteica.

Desta forma não é possível garantir com certeza absoluta que a reticulação se mantenha para além dos 7 dias de armazenamento em refrigeração a 4 °C. Para além disso, os dados do

pH também registaram uma queda mais notória ao fim deste período o que indica que do ponto de vista físico-químico (e também a até certo ponto microbiológico) o produto perdeu qualidade.

Para prolongar o tempo de vida deste produto talvez fosse aconselhado melhorar as condições de armazenamento; existem estudos que falam por exemplo na eficácia de embalagem em atmosfera modificada para alimentos semelhantes (Papaioannou *et al.*, 2007).

4. Conclusões

O soro de queijo difere de um soro comercial em pó em termos de composição. O soro comercial tem como base concentrado e isolado proteico mas também lhe são adicionados outros ingredientes como por exemplo emulsionantes, espessantes, edulcorantes, aromatizantes e corantes. Quanto ao soro de queijo apesar de não ter estes aditivos, também contém água, lactose e outros constituintes minoritários, como a gordura e sais minerais. Isso traduz-se por exemplo numa diferença de pH. O soro de queijo utilizado é mais ácido, inclusivamente em relação aos soros de queijo habituais que costumam ser doces. Contudo há excepções como é por exemplo o queijo fresco, em que a coagulação é feita por abaixamento de pH. Por conseguinte todos os parâmetros da caracterização do soro foram mais concordantes com os valores de soros de iogurte (ácido). Apenas o conteúdo proteico encontrado ($17,2 \text{ g L}^{-1}$) foi bastante superior ao usual. Esta diferença deve-se ao facto da composição do soro leite bovino poder variar substancialmente dependendo do leite utilizado e da variedade de queijo produzido.

É necessário um pré-aquecimento a 80°C durante 1h de maneira a desnaturar a estrutura tridimensional compacta da β -lactoglobulina (a proteína mais alergénica do leite e do soro). Só assim os resíduos de lisina e glutamina ficam suficientemente expostos e disponíveis para que posteriormente a TG possa actuar. Também tem de se fazer um acerto de pH a 7 (pH óptimo de actuação da enzima). Verificou-se que se o acerto for feito em primeiro lugar há um aumento da eficácia do processo de desnaturação; se o acerto fôr só posterior ao aquecimento há, pelo contrário, atenuação desse efeito. No entanto, só este último caso permite garantir que, mais tarde, quando se adiciona a transglutminase, o pH do meio está efectivamente a 7 (pH óptimo de actuação da TG). Isto porque na condição em que o acerto de pH a 7 é feito previamente, ao medir o pH no fim do aquecimento verificou-se que este voltou a baixar para um valor próximo do inicial.

Com a adição da enzima TG conclui-se que de facto o aquecimento tem de ser feito em primeiro lugar e só depois o acerto de pH a 7. Verificou-se, igualmente, que a utilização de concentrações demasiado elevadas de TG conduzem a piores resultados de reticulação do que concentrações inferiores; a dose de 100 U TG g^{-1} proteína é a ideal, quer para aplicação no soro comercial quer para aplicação no soro de queijo. O estudo determinou que o tempo mínimo necessário para que ocorra o máximo de reacção de reticulação das proteínas do soro de queijo pela TG seja de 6 horas.

Relativamente à estabilidade do produto final registou-se a partir do décimo dia uma diminuição do conteúdo proteico reticulado, que deverá estar relacionado com a proteólise.

Para além disso os dados do pH/acidez também registaram alterações mais notórias ao fim deste período o que indica que do ponto de vista físico-químico (e também e até certo ponto microbiológico) o produto perdeu qualidade após os 10 dias de armazenamento a 4°C. Desta forma não é possível garantir com certeza absoluta que a reticulação se mantenha para além dos 7 dias de armazenamento com refrigeração a 4 °C.

Conclui-se também que o FTIR, um dos métodos utilizados para avaliar cada uma das etapas que envolvem a reticulação com TG, é de facto uma técnica que pode ser utilizada para este fim. Dá resultados credíveis que são corroborados pelas outras duas técnicas - eletroforese SDS-PAGE e metodologia de Kuchroo e Fox. Verificou-se ainda que a electroforese SDS-PAGE para análise da reticulação pode ser limitada, o que só realça ainda mais a necessidade de utilizar uma técnica (como o FTIR) que seja ao mesmo tempo rápida, precisa e sensível para seguir a reticulação. No entanto, devem ser realizados mais estudos, por exemplo com proteínas puras, para se perceber melhor o potencial de aplicação do FTIR no acompanhamento da reticulação, e de que forma se pode utilizar também esta técnica para a quantificação.

Futuramente deverão ser investigadas formas de prolongar o tempo de prateleira do produto reticulado. Seria igualmente útil avaliar as suas propriedades funcionais porque isso determina as possíveis aplicações por exemplo em smoothies, batidos ou sobremesas lácteas. Este tipo de produtos pode constituir uma boa oportunidade comercial para os pequenos produtores que os podem desenvolver, evitando os elevados custos da usual transformação em pó. Por outro lado, e apesar de se ter observado a reticulação, seria importante perceber se o produto reticulado mantém ou reduz o seu potencial alergénico. Poder-se-ia ainda testar a combinação da aplicação de TG com outras técnicas de redução da alergenicidade de forma a dar resposta a este problema premente das indústrias que produzem soro.

5. Referências

- Agyare, K. K., Damodaran, S. (2010) pH-stability and thermal properties of microbial transglutaminase-treated whey protein isolate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58, 1946-1953.
- Allain, A., Paquin, P., Subirade, M. (1999) Relationships between conformation of β -lactoglobulin in solution and gel states as revealed by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 26, 337-244.
- Almeida, K. E. de, Bonassi, I. A., Roça, R. O. (2001) Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas Frescal. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 21(2), 187-192.
- Báez, G. D., Moro, A., Ballerini, G. A., Busti, P. A., Delorenzi, N. J. (2011) Comparison between structural changes of heat-treated and transglutaminase cross-linked beta-lactoglobulin and their effects on foaming properties. *Food Hydrocolloids* 25, 1758-1765.
- Bald, J. A., Vicenzi, A., Gennari, A., Lehn, D. N., Souza, C. F. V. (2014) Características físico-químicas de soros de queijo e ricotta produzidos no Vale do Taquari, RS. *Revista Jovens Pesquisadores* 4(1), 90-99.
- Ball, G., Shelton, M. J., Walsh, B. J., Hill, D. J., Hosking, C. S., Howden, M. E. H. (1994) A major continuous allergenic epitope of bovine β -lactoglobulin recognized by human IgE binding. *Clinical and Experimental Allergy* 24, 758-764.
- Bagheri, L., Yarmand, M., Madadlou, A., Mousavi, M. E. (2014) Transglutaminase-induced or citric acid-mediated cross-linking of whey proteins to tune the characteristics of subsequently desolvated sub-micron and nano-scaled particles. *Journal of Microencapsulation* 31(7), 636-643.
- Barth, A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *BBA-Bioenergetics* 1767(9), 1073-1101.
- Biasutti, E. A. R. (2006) Otimização das condições da hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos: utilização da subtilisina e da pancreatina. Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Bu, G., Luo, Y., Zhang, Y., Chen, F. (2010) Effects of fermentation by lactic acid bacteria on the antigenicity of bovine whey proteins. *Journal of Science and Food Agriculture* 90 (12), 2015–2020.

- Bu, G., Luo, Y., Chen, F., Liu, K., Zhu, T. (2013) Milk processing as a tool to reduce cow's milk allergenicity: a mini-review. *Dairy Science & Technology* 93, 211-223.
- Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T., Sawyer, L. (1997) Bovine β -Lactoglobulin at 1.8 Å resolution –still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5(4), 481-495.
- Byler, D. M., Susi, H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25, 469-487.
- Byler, D. M., Purcell, J. M. (1989) FTIR examination of thermal denaturation and gel-formation in whey proteins. *SPIE Fourier Transform Spectroscopy* 1145, 415-417.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., Rivas, J. (2013) Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, 385-396.
- Cattaneo, T. M. P., Giardina, C., Sinelli, N., Riva, M., Giangiacomo, R. (2005) Application of FT-NIR and FTIR spectroscopy to study the shelf-life of Crescenza cheese. *International Dairy Journal* 15, 693-700.
- Chen, M., Irudayaraj, J. (1998) Sampling technique for cheese analysis by FTIR Spectroscopy. *Journal of Food Science* 63(1), 96-99.
- Clare, D. A., Daubert, C. R. (2010) Transglutaminase catalysis of modified whey protein dispersions. *Journal of Food Science* 75(4), 369-377.
- Crittenden, R. G., Bennet, L. E (2005) Cow's milk allergy: A complex disorder. *Journal of the American College of Nutrition* 24(6), 582S-591S.
- Cunha, S. O. M. (2015) Avaliação da estabilidade do soro de iogurte. *Dissertação de Mestrado, FCT/UNL, Monte da Caparica*, 6-13.
- Damodaran, S., Agyare, K. K. (2013) Effect of microbial transglutaminase treatment on thermal stability and pH-solubility of heat-shocked whey protein isolate. *Food Hydrocolloids* 30, 12-18.
- Davis, P. J., Williams, S. C. (1998) Protein modification by thermal processing. *Allergy* 53(46), 195-206.
- Dissanayake, M., Ramchandran, I., Piyadasa, C., Vasiljevic, T. (2013) Influence of heat and pH on structure and conformation of whey proteins. *International Dairy Journal* 28, 56-61.
- Duan, C. C., Li, A. L., Yang, L. J., Zhao, R., Fan, W. G., *et al.* (2014) Comparison of immunomodulating properties of beta-lactoglobulin and its hydrolysates. *Iran Journal Allergy Asthma Immunology* 13(1), 26-32.
- Echavarría, A. P., Pagán, J., Ibarz, A. (2012) Melanoidins formed by Maillard Reaction in food and their biological activity. *Food Engineering Reviews* 4, 203-223.

Ehn, B., Ekstrand, B., Bengtsson, U., Ahlstedt, S. (2004) Modification of IgE binding during heat processing of the cow's milk allergen β -lactoglobulin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 1398-1403.

Eissa, A. S., Bisram, S., Khan, S. A. (2004) Polymerization and gelation of whey proteins isolates at low pH using transglutaminase enzyme. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 4456-4464.

Eissa, A. S., Khan, S. A. (2005) Acid-induced gelation of enzymatically modified, preheated whey proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53, 5010-5017.

Eissa, A. S., Khan, S. A. (2006) Modulation of hydrophobic interactions in denatured whey proteins by transglutaminase enzyme. *Food Hydrocolloids* 20, 543-547.

Eissa, A. S., Puhl, C., Kadla, J. F., Khan, S. A. (2006) Enzymatic cross-linking of β -lactoglobulin: Conformational properties using FTIR spectroscopy. *Biomacromolecules* 7, 1707-1713.

El-Agamy, E. I. (2007) The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research* 68, 64-72.

EU (2008) Regulation (EC) No 1332/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food enzymes and amending Council Directive 83/417/EEC, Council Regulation (EC) No 1493/1999, Directive 2000/13/EC, Council Directive 2001/112/EC and(..). *Off. J. Eur. Union L 354 51 (1332): 7–15.*

Fang, Y., Dalgleish, D. G. (1997) Conformation of β -lactoglobulin studied by FTIR: Effect of pH, temperature, and absorption to the oil-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science* 196, 292-298.

Fang, Y., Dalgleish, D. G. (1998) The conformation of α -lactalbumin as a function of pH, heat treatment and absorption surfaces studied by FTIR. *Food Hydrocolloids* 12, 121-126.

Fernando, A. L., Aguiar, S. S., Veloso, M. I., Franco, R. (2017) Control of Milk Allergenicity. *Journal of Dairy and Veterinary Sciences* 2(5), 555600.

Gallardo-Escamilla, F. J., Kelly, A. L., Delahunty, C. M. (2005) Sensory characteristics and related volatile flavor compound profiles of different types of whey. *Journal of Dairy Science* 88(8), 2689-2699.

Gauche, C., Barreto, P. L. M., Bordignon-Luiz, M. T. (2010) Effect of thermal treatment on whey protein polymerization by transglutaminase: Implications for functionality in processed dairy foods. *Food Science and Technology* 43, 214-219.

Gauche, C., Vieira, J. T. C., Ogliari, P. J., Bordignon-Luiz, M. T. (2008) Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase. *Process Biochemistry* 43, 788-794.

Giroto, J. M., Pawlowsky, U. (2001) O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. *Brasil Alimentos* 10, 43-46.

Hattori, M. (1994) Functional Changes in β -Lactoglobulin by Conjugation with Carboxymethyl Dextran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 42, 2120–2125.

Hosseinpour, S., Izadi, M., Aminlari, M., Ramezani, R., Tavana, M. (2011) Changes in the solubility and SDS-PAGE profile of whey proteins during storage at different temperatures: A kinetic study. *Journal of Food and Agriculture Science* 1(1), 15-21.

Hough, G., Pugliese, M. L., Sanchez, R., Silva, O. M. (1999) Sensory and Microbiological shelf-life of a commercial ricotta cheese. *Journal of Dairy Science* 82, 454-459.

Huppertz, T. (2013) Heat stability of transglutaminase-treated milk. *International Dairy Journal*, 1-4.

Iñón, F. A., Garrigues, S., Guardia, M. (2004) Nutritional parameters of commercially available milk samples by FTIR and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta* 513, 401-412.

Izquierdo, J. F., Gomez, A. I., Ramaswamy, H. S., Yaylayan, V. (2005) Effects of high pressure and microwave on pronase and α -chymotrypsin hydrolysis of β -lactoglobulin. *Food Chemistry* 92(4), 713-719.

Jackson, M., Mantsch, H. H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30(2), 95-120.

Jarvinen, K., Chatchatee, P., Bardina, L., Byer, K., Sampson, H. A. (2001) IgE and IgE binding epitopes on α -lactoalbumin and β -lactoglobulin in cow's milk allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*. 126, 111-118.

Jedrychowski, L. (1999) Reduction of the Antigenicity of Whey Proteins by Lactic Acid Fermentation. *Food and Agriculture Immunology* 11, 91–99.

Johansen, A. G., Vegarud, G. E., Skeie, S. (2002) Seasonal and regional variation in the composition of whey from Norwegian Cheddar-type and Dutch-type cheeses. *International Dairy Journal*, 621-629.

Jong, G. A. H., Koppelman, S. J. (2002) Transglutaminase catalysed reactions: impact on food applications. *Journal of Food Science* 67(8), 2798- 2806.

Jovanovic, S., Barac, M., Macej, O., Vucic, T., Lacnjevac, C. (2007) SDS-PAGE analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatments. *Sensors* 7, 371-383.

Kieliszek, M., Misiewicz, A. (2014) Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica* 59, 241-250.

- Kong, J., Yu, S. (2007) Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39(8), 549-559.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L. (2004) Invited review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science* 87, 785-796.
- Kuchroo, C. N., Fox, P. F. (1982) Soluble nitrogen in Cheddar cheese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37(6), 331-335.
- Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C. A., Goto, Y. (1999) Solution structure and dynamics of bovine β -lactoglobulin A. *Protein Science* 8, 2541-2545.
- Lagrange, V., Whitsett, D., Burris, C. (2015) Global Market for Dairy Proteins. *Journal of Food Science* 80, 16-22.
- Lefèvre, T., Subirade, M. (1999) Structural and interaction properties of β -Lactoglobulin as studied by FTIR spectroscopy. *International Journal of Food Science and Technology* 34, 419-428.
- Lima, T. C. C., Rangel, A. H. N., Macêdo, C. S., Araújo, T. P. M., Araújo, V. M., Júnior, D. M. L., Murmann, L., Novaes, L. P. (2014) Composição e qualidade do leite e do soro do leite de búfalas nos estados do Rio Grande do Norte. *Acta Veterinaria Brasilica* 8(1), 25-30.
- Lira, H. L., Silva, M. C. D., Vasconcelos, M. R. S., Lira, H. L., Lopez, A. M. (2009) Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* 29, 33-37.
- Lorenzen, P. C. H. R., Neve, H., Mautner, A., Sclimme, E. (2002) Effect of enzymatic cross-linking of milk proteins on functional properties of set-style yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* 55(3), 152-157.
- Martinho, J. E. T. C. (2008) Contribuição para o estudo da hidrólise enzimática acelerada da β -lactoglobulina por meio de ultra-sons. Dissertação de Mestrado, FCT/UNL, Monte da Caparica, p.11, 15-20.
- McSweeney, P. L., Fox, P. F. (1997) Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Le Lait* 77(1), 41-76.
- Micinski, J., Kowalski, I. M., Zwierzchowski, G., Szarek, J., Pierozynski, B., Zablocka, E. (2013) Characteristics of cow's milk proteins including allergenic properties and methods for its reduction. *Polish Annals of Medicine* 20, 69-76.
- Mills, E. N. C., Sancho, A. I., Riggby, N. M., Jenkins, J. A., Mackie, A. R. (2009) Impact of food processing on structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research* 53, 963-969.

Monaci, L., Tregoat, V., Van Hengel, A. J., Anklam, E. (2006) Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review. *European Food Research and Technology* 223(2), 149-179.

Monahan, F. J., German, J. B., Kinsella, J. E. (1995) Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulphide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 43, 46-52.

Moreira, C. (2011) Desenvolvimento de metodologias analíticas para queijos. Dissertação de Mestrado, ISA/UTA, Lisboa, p.9.

Moro, A., Báez, G. D., Busti, P. A., Ballerini, G., Delorenzi, N. J. (2011) Effects of heat-treated β -lactoglobulin and its aggregates on foaming properties. *Food Hydrocolloids* 25, 1009-1015.

Mottram, D. S., Weszicha, B. L., Dodson, A. T. (2002) Acrylamide is formed in the Maillard Reaction. *Nature* 419, 448.

Nagasawa, K., Takahashi, K., Hattori, M. (1996) Improved emulsifying properties of β -lactoglobulin by conjugating with carboxymethyl dextran. *Food Hydrocolloids* 10 (1). 63–67.

Nogales, J. M. (2006) Effect of preheat treatment on the transglutaminase-catalysed cross-linking of goat milk proteins. *Process Biochemistry* 41, 430-437.

Nogales, J. M. (2006) Enhancement of transglutaminase-induced protein cross-linking by preheat treatment of cow's milk: A statistical approach. *International Dairy Journal* 16, 26-32.

Olivier, C. E., Lima, R. P. S., Pinto, D. G., Santos, R. A. P. G., Silva, G. K. M., Lorena, S. L. S., Villas-Boas, M. B., Netto, F. M., Zollner, R. L. (2012) In search of a tolerance-induction strategy for cow's milk allergies: significant reduction of beta-lactoglobulin allergenicity via transglutaminase/cysteine polymerization. *Clinics* 67(10), 1171-1179.

Oliveira, C. M., Silva, O. F., Silva, M. C., Régis, S. A., Cabral, L. C., Cenci, S. A. (2008) Utilização do soro de leite bovino como revestimento protetor em morangos. *B. CEPPA* 26(2), 187-196.

Ozrenk, E. (2006) The use of transglutaminase in dairy products. *International Journal of Dairy Technology* 59(1), 1-7.

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Ghandi, D. N., Bunko, K. (2007) Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105(1), 1-14.

Papaioannou, G., Chouliara, I., Karatapanis, A. E., Kontominas, M. G., Savvaidis, I. N. (2007) Shelf-life of a greek whey cheese under modified atmosphere packaging. *International Dairy Journal* 17, 358-364

Parris, N., Purcell, J. M., Ptashkin, S. M. (1991) Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 39, 2167-2170.

Patel, Seema (2015) Emerging trends in nutraceutical applications of whey protein and its derivatives. *Journal of Food Science and Technology* 52 (11), 6847-6858.

Pelegrine, D. H. G., Carrasqueira, R. L. (2008) Aproveitamento do soro de leite no enriquecimento nutricional de bebidas. *Brazilian Journal of Food and Technology* VII, 145-151.

Pelegrine, D. H. G., Gasparetto, C. A. (2005) Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 38, 77-80.

Penna, A. L. B., Almeida, K. E., Oliveira, M. N. (2009) Soro de leite: importância biológica, comercial e industrial - principais produtos. In: OLIVEIRA, M.N (ed.) *Tecnologia de produtos lácteos funcionais*. São Paulo, Atheneu.

Peyron, S., Mouécoucou, J., Frémont, S., Sanchez, C., Gontard, N. (2006) Effects of heat treatment and pectin addition on β -lactoglobulin allergenicity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54(15), 5643-5650.

Pierro, P., Sorrentino, A., Mariniello, L., Giosafatto, C. V. L., Porta, R. (2011) Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. *Food Science and Technology* 44, 2324-2327.

Pintado, M. E., Macedo, A. C., Malcata, F. X. (2001) Review: Technology, Chemistry and Microbiology of Whey Cheeses. *Food Science and Technology International* 7 (2), 105-116.

Prado, A., Muga, A., Castresana, J., Goñi, F. M., Arrondo, J. R. R. (1990) Solubilization of sarcoplasmic reticulum membranes by sodium dodecylsulfate: A Fourier-transformed infrared spectroscopy study. *FEBS Letter* 269(2), 324-327.

Prazeres, A. R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012) Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management* 110, 48-68.

Raksakulthai, R., Haard, N. F. (2003) Exopeptidases and their application to reduce bitterness in food: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(4), 401-445.

Sabadin, I. S., Villas-Boas, M. B., Zollner, R. L., Netto, F. M. (2012) Effect of combined treatment of hydrolysis and polymerization with transglutaminase on β -lactoglobulin antigenicity. *European Food Research and Technology*.

Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I., Wu, S. (1998) β -Lactoglobulin: Structural Studies, Biological Clues. *International Dairy Journal* 8, 65-72.

Schmidt, K., Bouma, J. (1992) Estimating shelf-life of cottage cheese using hazard analysis. *Journal of Dairy Science* 75, 2922-2927.

Schokker, E. P., Singh, H., Creamer, L. K. (2000) Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin A and B with α -lactalbumin. *International Dairy Journal* 10, 843-853.

- Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., Norris, G. E., Creamer, L. K. (1999) Characterization of intermediates formed during heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at neutral pH. *International Dairy Journal* 9, 791-800.
- Siso, M. I. G. (1996) The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: A Review. *Bioresource Technology* 57, 1-11.
- Sharma, S., Kumar, P., Betzel, C., Singh, T. P. (2001) Structure and function of proteins involved in milk allergies. *Journal of Chromatography B* 756, 183-187.
- Smithers, Geoffrey W. (2008) Whey and whey proteins – From “gutter-to-gold”. *Int. Dairy Journal* 18, 695-704.
- Soares, C. P. (2013) Influência da redução de sal nas propriedades do queijo de São João da ilha do Pico. Dissertação de Doutorado, FCT/UNL, Monte da Caparica, p.4.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, F. A., Robert, M., Riediker, S. (2002) Acrylamide from Maillard Reaction products. *Nature* 419, 449.
- Stadler, M., Stadler, B. M. (2003) Allergenicity prediction by protein sequence. *The FASEB Journal* 17(9), 1141-1143
- Steele, R. (2004) Understanding and measuring the shelf-life of food. Boca Raton, Boston, New York, Washington: CRC Press.
- Tanimoto, S., Kinsella, J. E. (1988) Enzymatic modification of proteins: effects of transglutaminase cross-linking on some physical properties of β -lactoglobulin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36, 281-285.
- Teixeira, L.V., Fonseca, L.M. (2008) Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica*, 60(1), 243-250.
- Truong, V., Clare, D. A., Catignani, G. L., Swaisgood, H. E. (2004) Cross-linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 1170-1176.
- Viljoen, B. C. (2001) The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1), 37-44.
- Villas-Boas, M. B., Fernandes, M. A., Zollner, R. L., Netto, F. M. (2012) Effect of polymerization with transglutaminase on in vitro digestion and antigenicity of β -lactoglobulin. *International Dairy Journal* 25, 123-131.
- Villas-Boas, M. B., Vieira, K. P., Trevizan, G., Zollner, R. L., Netto, F. M. (2010) The effect of transglutaminase-induced polymerization in the presence of cysteine on β -lactoglobulin antigenicity. *International Dairy Journal* 20, 386-392.

Voort, F. R. (1992) Fourier transform infrared spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International* 25, 397-403.

Voort, F. R., Sedman, J., Ismail, A. A. (1993) A rapid FTIR quality-control method for determining fat and moisture in high-fat products. *Food Chemistry* 48, 213-221.

Watanabe, F. S., & Olsen, S. R. (1965). Test of an ascorbic acid method for determining phosphorus in water and NaHCO₃ extracts from the soil. *Soil Science Society of America Journal*, 29(6), 677-678.

Watts, S., Halliwell, L. (1996). Appendix 3 – Detailed field and chemical methods for soil. In S. Watts, L. Halliwell, *Essential Environmental Science, Methods & Techniques* (475-505) Routledge, Londres, Reino Unido.

Wen-qiong, W., Lan-wei, Z., Xue, H., Yi, L. (2017) Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. *Food Chemistry* 215, 31-40.

Wróblewska, B., Kaliszewska, A., Kolakowski, P., Pawlikowska, K., Troszynska, A. (2011) Impact of transglutaminase reaction on the immunoreactive and sensory quality of yoghurt starter. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27, 215-227.

Xin, L., Jinyam, G., Shensfa, H., Yuanyuan, W., Hongbing, C. (2014) Identification of conformational antigenic epitopes and dominant aminoacids of buffalo β -lactoglobulin. *Journal of Food Science* 79(4), 748-756.

Zall, R. R. (1992) Sources and composition of whey and permeate. In *Whey and lactose processing* (1-72). Netherlands: Springer.

Zhong, Q., Wang, W., Hu, Z., Ikeda, S. (2013) Sequential preheating and transglutaminase pretreatments improve stability of whey protein isolate at pH 7.0 during thermal sterilization. *Food Hydrocolloids* 31, 306-316.

Zhu, Y., Tramper, J. (2008) Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends in Biotechnology* 26(10), 559-565.

ANEXOS

II. Materiais e métodos

II.1 Proteína/Azoto total e avaliação da proteólise

Tabela II.1. Lista de soluções utilizadas na metodologia adaptada de Kuchroo e Fox.

Soluções	Receita
Solução indicadora	Juntar a solução indicadora de vermelho de metilo e a solução indicadora de azul de metilo, conservar num frasco escuro e a 4°C
Solução indicadora de vermelho de metilo	0,2 g de vermelho de metilo (<i>MERCK</i>) Perfazer com álcool etílico a 95°C até 100mL
Solução indicadora de azul de metilo	0,1 g de azul de metilo (<i>HIMEDIA</i>) Perfazer com álcool etílico a 95°C até 50mL
Mistura catalisadora	100 g de sulfato de potássio (<i>Chem-Lab</i> , ≥99%) 1g de selénio negro (<i>ACROS ORGANIC</i> , ≥99%)
Solução PTA 33,3% (m/v), para 50mL	16,5 g de PTA, ácido fosfotungstico (<i>Acros Organic</i> , 82%) 50 mL de H ₂ O ultra-pura
Solução H₂SO₄ 3,95M	Num balão de 100mL: 25 mL de H ₂ O ultra-pura 22 mL H ₂ SO ₄ 18M (<i>Chem-Lab</i> , 95-97%) Perfazer com H ₂ O ultra-pura
Solução TCA 24% (m/v), para 100mL	24 g de TCA, ácido tricloroacético (<i>PanReac AppliChem</i>); 100 mL de H ₂ O ultra-pura

II.2. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Tabela II.2. Reagentes e respetiva quantidade para a realização de dois géis de poliacrilamida.

Reagentes	Gel de resolução 12%	Gel de separação 5%
Água ultra-pura	3,3 mL	2,1 mL
Mix de acrilamida 30% (Bio-Rad)	4,0 mL	0,5 mL
Tampão de resolução, pH 8.8 (tabela II.3)	2,5 mL	---
Tampão de separação, pH 6.8 (tabela II.3)	---	0,38 mL
Dodecil sulfato de sódio 10% (SDS, Panreac)	0,1 mL	0,03 mL
Persulfato de amónia 10% (APS, Sigma Aldrich, ≥98%)	0,1 mL	0,03 mL
Tetrametiletlenodiamina (TEMED, Bio Rad)	0,004 mL	0,003 mL

Tabela II.3. Lista de soluções e respetiva receita utilizadas na eletroforese de poliacrilamida em SDS.

Soluções	Receita
Tampão de resolução	18,17 g de Tris Base 1,5M (Carlo Erba reagentes) Ácido clorídrico até pH=8,8 (Scharlau, 36,5-38%) 4 mL de SDS 10% (Panreac) H ₂ O ultra-pura até perfazer 100 mL
Tampão de separação	6,06 g de Tris Base 0,5M (Carlo Erba reagentes) Ácido clorídrico até pH=6.8 (Scharlau, 36.5-38%) 4 mL de SDS 10% (Panreac) H ₂ O ultra-pura até perfazer 100 mL
SDS 10%	10 g de SDS (Panreac) 100 mL de H ₂ O ultra pura
APS 10%	10 mg de APS (Sigma Aldrich, ≥98%) 10 mL de H ₂ O ultra pura
Tampão de corrida 10x	144,1 g de glicina 1,92M (Sigma Aldrich, ≥99%) 30,3 g de Tris Base 0,25M (Carlo Erba reagentes) 10 g de SDS (Panreac)
Tampão de amostra	2 mL de glicerol (Panreac, 87%) 1 mL de β-mercaptoetanol (Sigma Aldrich, ≥99%) 5 mL de SDS 10% (Panreac) 2.5 mL de tampão de separação 2 mg de azul de bromofenol (Panreac)
Solução corante	1 g de azul de Coomassie R-250 (Sigma Aldrich) 15 mL de ácido acético (Carlo Erba reagentes) 90 mL de metanol (Sigma Aldrich, ≥99,8%) H ₂ O ultra-pura até perfazer 200 mL
Solução descorante	75 mL de ácido acético (Carlo Erba reagentes) 450 mL de metanol (Sigma Aldrich, ≥99,8%) H ₂ O ultra-pura até perfazer 1000 mL

III. Resultados

III.1. Soro comercial

III.1.1. Diferentes condições de pré-tratamento

Tabela III.1. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento, sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	6,62
Folhas-β Intramoleculares	1637	24,78
Hélices-α	1649	54,82
Folhas-β Intermoleculares	1661	10,34
Folhas-β Intramoleculares	1671	3,84

Tabela III.2. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (ii) com acerto de pH, sem aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1626	7,04
Folhas-β Intramoleculares	1637	29,92
Hélices-α	1649	41,79
Folhas-β Intermoleculares	1660	17,67
Folhas-β Intramoleculares	1672	3,58

Tabela III.3. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iii) sem acerto de pH, com aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1622	10,57
Folhas-β Intramoleculares	1631	17,98
Hélices-α	1641	26,36
Folhas-β Intermoleculares	1653	27,82
Folhas-β Intramoleculares	1667	17,27

Tabela III.4. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	16,1
Folhas-β Intramoleculares	1638	25,02
Hélices-α	1648	26,09
Folhas-β Intermoleculares	1659	20,31
Folhas-β Intramoleculares	1671	12,48

Tabela III.5. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (v) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1626	7,58
Folhas-β Intramoleculares	1636	21,78
Hélices-α	1648	48,23
Folhas-β Intermoleculares	1657	3,97
Folhas-β Intramoleculares	1665	18,44

III.1.2. Diferentes concentrações de transglutaminase adicionadas ao soro comercial preparado nas melhores condições de pré-tratamento.

III.1.2.1 Com acerto de pH seguido de aquecimento

Tabela III.1. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1626	11,46
Folhas-β Intramoleculares	1634	17,42
Hélices-α	1644	25,85
Folhas-β Intermoleculares	1654	28,06
Folhas-β Intramoleculares	1666	17,2

Tabela III.7. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	15,16
Folhas-β Intramoleculares	1637	26,63
Hélices-α	1646	25,65
Folhas-β Intermoleculares	1655	21,74
Folhas-β Intramoleculares	1666	10,82

Tabela III.8. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	14,69
Folhas-β Intramoleculares	1637	26,25
Hélices-α	1647	28,23
Folhas-β Intermoleculares	1657	20,41
Folhas-β Intramoleculares	1667	10,40

Tabela III.9. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	14,12
Folhas-β Intramoleculares	1637	24,36
Hélices-α	1646	27,67
Folhas-β Intermoleculares	1656	22,43
Folhas-β Intramoleculares	1667	11,42

Tabela III.10. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	13,08
Folhas-β Intramoleculares	1637	23,36
Hélices-α	1647	28,93
Folhas-β Intermoleculares	1657	23,10
Folhas-β Intramoleculares	1667	11,52

III.1.2.2 Com acerto de pH seguido de aquecimento

Tabela III.11. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1626	11,46
Folhas-β Intramoleculares	1635	18,07
Hélices-α	1644	25,15
Folhas-β Intermoleculares	1654	28,04
Folhas-β Intramoleculares	1666	17,28

Tabela III.12. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	9,50
Folhas-β Intramoleculares	1634	16,39
Hélices-α	1642	21,44
Folhas-β Intermoleculares	1651	29,01
Folhas-β Intramoleculares	1661	23,67

Tabela III.13. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	9,88
Folhas-β Intramoleculares	1634	15,86
Hélices-α	1642	21,09
Folhas-β Intermoleculares	1651	29,26
Folhas-β Intramoleculares	1662	23,90

Tabela III.14. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	13,58
Folhas-β Intramoleculares	1638	26,02
Hélices-α	1647	29,10
Folhas-β Intermoleculares	1657	20,45
Folhas-β Intramoleculares	1667	10,85

Tabela III.15. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	13,15
Folhas-β Intramoleculares	1638	24,36
Hélices-α	1647	27,59
Folhas-β Intermoleculares	1657	22,08
Folhas-β Intramoleculares	1666	12,82

III.2. Soro de queijo

III.2.1. Simples e preparado nas duas melhores condições de pré-tratamento

Tabela III.16. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem acerto de pH, sem aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1631	10,60
Folhas-β Intramoleculares	1638	18,54
Hélices-α	1645	22,56
Folhas-β Intermoleculares	1653	33,21
Folhas-β Intramoleculares	1661	15,10

Tabela III.17. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	13,00
Folhas-β Intramoleculares	1636	23,24
Hélices-α	1645	26,03
Folhas-β Intermoleculares	1654	25,02
Folhas-β Intramoleculares	1664	12,71

Tabela III.18. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (v) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1625	9,80
Folhas-β Intramoleculares	1633	16,22
Hélices-α	1641	23,15
Folhas-β Intermoleculares	1650	28,29
Folhas-β Intramoleculares	1661	22,55

III.2.2. Diferentes concentrações de transglutaminase adicionadas ao soro de queijo preparado nas melhores condições de pré-tratamento.

III.2.2.1 Com acerto de pH seguido de aquecimento

Tabela III.19. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1630	19,71
Folhas-β Intramoleculares	1639	27,23
Hélices-α	1648	25,84
Folhas-β Intermoleculares	1657	20,03
Folhas-β Intramoleculares	1668	7,19

Tabela III.20. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	15,16
Folhas-β Intramoleculares	1637	26,63
Hélices-α	1646	25,65
Folhas-β Intermoleculares	1655	21,74
Folhas-β Intramoleculares	1666	10,82

Tabela III.21. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	14,69
Folhas-β Intramoleculares	1637	26,25
Hélices-α	1647	28,23
Folhas-β Intermoleculares	1657	20,41
Folhas-β Intramoleculares	1667	10,40

Tabela III.22. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	14,12
Folhas-β Intramoleculares	1637	24,36
Hélices-α	1646	27,67
Folhas-β Intermoleculares	1656	22,43
Folhas-β Intramoleculares	1667	11,42

Tabela III.23. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	13,08
Folhas-β Intramoleculares	1637	23,36
Hélices-α	1647	28,93
Folhas-β Intermoleculares	1657	23,10
Folhas-β Intramoleculares	1667	11,52

III.2.2.2 Com aquecimento seguido de acerto de pH

Tabela III.24. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 50 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	10,72
Folhas-β Intramoleculares	1635	17,06
Hélices-α	1642	21,82
Folhas-β Intermoleculares	1651	28,36
Folhas-β Intramoleculares	1661	22,03

Tabela III.25. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	9,50
Folhas-β Intramoleculares	1634	16,39
Hélices-α	1642	21,44
Folhas-β Intermoleculares	1651	29,01
Folhas-β Intramoleculares	1661	23,67

Tabela III.26. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 200 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	9,88
Folhas-β Intramoleculares	1634	15,86
Hélices-α	1642	21,09
Folhas-β Intermoleculares	1651	29,26
Folhas-β Intramoleculares	1662	23,90

Tabela III.27. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 400 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	13,58
Folhas-β Intramoleculares	1638	26,02
Hélices-α	1647	29,10
Folhas-β Intermoleculares	1657	20,45
Folhas-β Intramoleculares	1667	10,85

Tabela III.28. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 600 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1628	13,15
Folhas-β Intramoleculares	1638	24,36
Hélices-α	1647	27,59
Folhas-β Intermoleculares	1657	22,08
Folhas-β Intramoleculares	1666	12,82

III.2.3. Cinética da reticulação pela TG na melhor condição de pré-tratamento e com a melhor quantidade de enzima adicionada

Tabela III.29. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro de queijo com 100 U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

	0h		2h		4h		6h		8h		10h	
Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1631	16,58	1629	12,28	1629	13,22	1627	9,97	1629	13,36	1628	12,37
Folhas-β Intramoleculares	1641	33,94	1638	27,96	1638	27,46	1635	17,84	1638	29,85	1638	28,94
Hélices-α	1651	32,64	1648	33,50	1647	27,67	1642	21,17	1649	33,90	1648	34,29
Folhas-β Intermoleculares	1659	11,46	1657	18,06	1655	20,67	1651	27,91	1658	15,60	1658	16,60
Folhas-β Intramoleculares	1666	5,38	1666	8,20	1664	10,97	1661	23,11	1666	7,29	1667	7,80

III.2.4. Estabilidade do produto final

Tabela III.30. Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo da avaliação da estabilidade soro de queijo na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, reticulado com 100 U de TG/g de proteína, durante 6 horas.

	Dia 0		Dia 3		Dia 7		Dia 10		Dia 15	
Estrutura Secundária	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm ⁻¹)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1623	11,48	1627	20,96	1626	10,13	1622	14,18	1629	18,71
Folhas-β Intramoleculares	1630	17,21	1637	30,34	1633	17,52	1636	23,28	1639	28,14
Hélices-α	1640	24,72	1648	26,76	1642	24,25	1645	26,86	1648	25,99
Folhas-β Intermoleculares	1650	27,87	1658	14,86	1651	27,44	1655	24,71	1656	19,13
Folhas-β Intramoleculares	1661	18,72	1668	7,08	1662	20,65	1664	10,92	1665	8,02

